

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

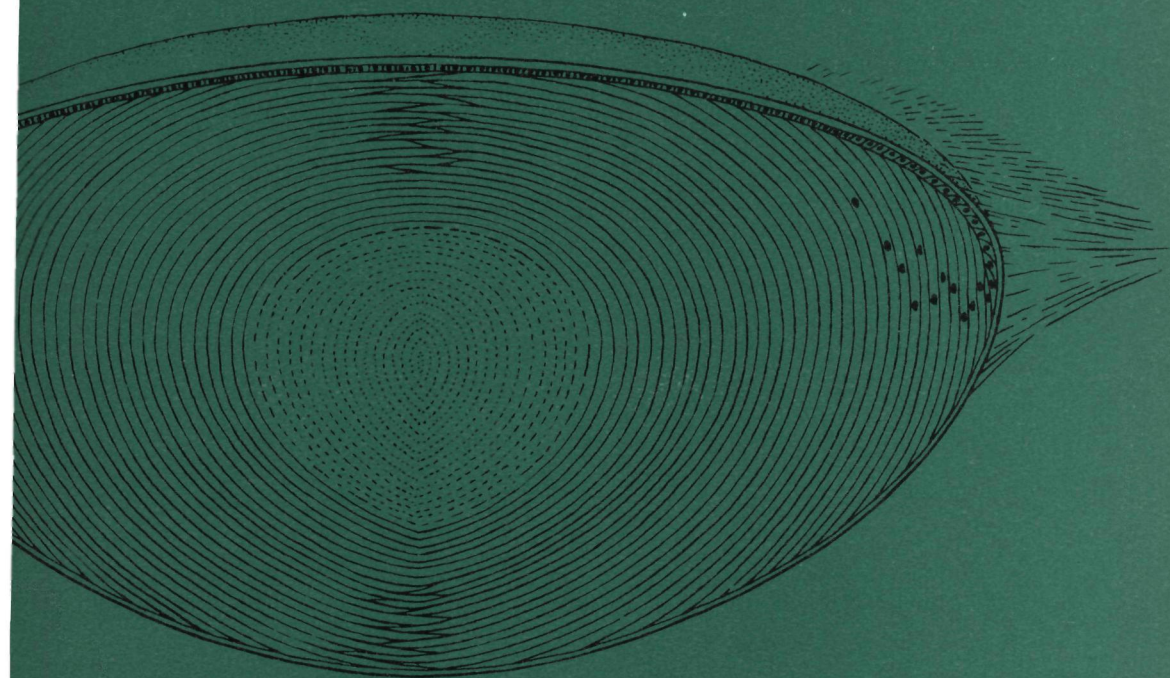
The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/148652>

Please be advised that this information was generated on 2018-07-07 and may be subject to change.

# de fosfolipiden van de lens



r. m. broekhuysen



**DE FOSFOLIPIDEN VAN DE LENS**  
**SAMENSTELLING EN METABOLISME ONDER**  
**NORMALE EN CATARACT INDUCERENDE OMSTANDIGHEDEN**

**PROMOTORES:**  
**PROF. DR. S. L. BONTING**  
**EN**  
**PROF. DR. J. E. A. VAN DEN HEUVEL**

# DE FOSFOLIPIDEN VAN DE LENS

SAMENSTELLING EN METABOLISME  
ONDER NORMALE EN  
CATARACT INDUCERENDE OMSTANDIGHEDEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR  
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. G. BRENNINKMEIJER,  
HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER SOCIALE WETENSCHAPPEN,  
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP  
MAANDAG 22 SEPTEMBER 1969 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR  
DOOR

RENÉ MARIA BROEKHUYSE

GEBOREN TE AMERSFOORT

1969

DRUKKERIJ GEBR. JANSSEN N.V. NIJMEGEN



*Aan mijn ouders  
Voor Ria en de kinderen*



Dit onderzoek werd verricht op het laboratorium van het Instituut voor Oogheelkunde (Directeur: Prof. Dr. J. E. A. van den Heuvel).

Dr. J. H. Veerkamp (Isotopenlaboratorium, Laboratorium voor Biochemie) gaf waardevolle adviezen bij de aanzet van het onderzoek en bood hulp bij de kritische beoordeling van gedeelten van dit proefschrift.

Drs. P. van Munster (Laboratorium voor Kindergeneeskunde) en Dr. J. H. Veerkamp (Isotopenlaboratorium, Laboratorium voor Biochemie) waren behulpzaam bij het verrichten van radioactiviteitsmetingen.

Technische bijstand werd verleend door Mej. G. J. M. L. De Vries en Mej. M. J. Custers. Dr. Ir. G. D. Vogels, Drs. J. M. P. Borggreeve en Drs. F. A. Exterkate (Laboratorium voor Biochemie) en Dr. J. M. F. Trijbels (Laboratorium voor Kindergeneeskunde) hebben medegewerkt aan de kritische beoordeling van gedeelten van het manuscript.

De tekeningen werden vervaardigd door de heer C. P. Nicolassen van de Medische Tekenkamer (hoofd: de heer Chr. van Huijzen).

Aan hen en aan alle anderen, die hebben bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift, betuig ik mijn hartelijke dank.

# INHOUDSOPGAVE

AFKORTINGEN . . . . .	XI
I. INLEIDING . . . . .	I
1.1 De lenslipiden . . . . .	I
1.1.1 Historisch overzicht betreffende de lenslipiden . . . . .	I
1.1.2 Het fosfolipidenmetabolisme van de lens . . . . .	3
1.1.3 De 'neutrale' lipiden en de glycolipiden . . . . .	3
1.1.4 De vetzuursamenstelling van de lenslipiden . . . . .	6
1.2 Energiemetabolisme en transport in de lens . . . . .	6
1.2.1 Het energiemetabolisme . . . . .	6
1.2.2 Het actief transport . . . . .	7
1.3 De suikercataract . . . . .	8
1.3.1 De diabetische cataract . . . . .	8
1.3.2 De galactosecataract . . . . .	9
1.3.3 De ultrastructuur van de galactosecataract . . . . .	11
1.4 Doel van het onderzoek . . . . .	12
Literatuurreferenties . . . . .	13
2. MATERIALEN EN METHODEN . . . . .	15
2.1 Proefdieren . . . . .	15
2.2 Cataracten, opgewekt in vivo . . . . .	15
2.3 Oogweefsels . . . . .	15
2.4 Extractie van lenslipiden . . . . .	16
2.5 Kwantitatieve dunnelaagchromatografie van intacte fosfolipiden . . . . .	17
2.6 Kwantitatieve dunnelaagchromatografie van plasmalogenen . . . . .	17
2.7 Kleurreagentia op lipiden . . . . .	18
2.8 Bepaling van lipidenfosfor na silicagelchromatografie . . . . .	18
2.9 Bepaling van radioactiviteit . . . . .	19
2.10 Diverse bepalingen . . . . .	19
2.11 Normale media voor lensincubatie . . . . .	19
2.12 Cataractogene media . . . . .	20

2.13	Incubatieomstandigheden . . . . .	20
2.14	Chemikaliën . . . . .	20
	Literatuurreferenties . . . . .	21
3.	IDENTIFICATIE EN KWANTITATIEVE ANALYSE VAN DIACYL- EN VINYL- ETHERFOSFOLIPIDEN IN OOGWEEFSELS . . . . .	23
3.1	Inleiding . . . . .	23
3.2	Materialen en methoden . . . . .	23
3.2.1	Hersenlipiden . . . . .	23
3.2.2	Erwtelipiden . . . . .	24
3.2.3	Kolomchromatografische bereiding van sfingomyeline en fosfatidylinositol . . . . .	24
3.2.4	Fosfatidezuur . . . . .	25
3.2.5	Lysofosfolipiden . . . . .	25
3.2.6	Synthetische fosfolipiden . . . . .	25
3.2.7	Zuivering en karakterisering . . . . .	25
3.2.8	Isolering van oogweefselfosfolipiden . . . . .	26
3.2.9	Karakterisering van oogweefselfosfolipiden . . . . .	26
3.2.10	Bepaling van de fosfolipidensamenstelling . . . . .	28
3.3	Resultaten en discussie . . . . .	29
3.3.1	Dunnelaagchromatografie . . . . .	29
3.3.2	Karakterisering van de fosfolipiden . . . . .	32
3.3.3	Kwantitatieve analyse . . . . .	33
3.4	Samenvatting . . . . .	35
	Literatuurreferenties . . . . .	36
4.	SAMENSTELLING EN METABOLISME VAN DE FOSFOLIPIDEN IN NORMALE DIERLIJKE LENZEN . . . . .	37
4.1	Inleiding . . . . .	37
4.2	Materialen en methoden . . . . .	37
4.3	Methoden . . . . .	37
4.3.1	Experimenten in vitro . . . . .	37
4.3.2	Experimenten in vivo . . . . .	38
4.3.3	De extractie van de lipiden . . . . .	38
4.3.4	Analytische en chromatografische technieken . . . . .	38
4.4	Resultaten en discussie . . . . .	39
4.4.1	De fosfolipidensamenstelling van de dierlijke lens . . . . .	39
4.4.2	De fosfolipidensamenstelling van lensfracties . . . . .	39
4.4.3	Veranderingen in fosfolipidensamenstelling tijdens de incubatie . . . . .	42

4.4.4	De $^{32}\text{P}$ -opname in de fosfolipiden van de lens en van lensfracties . . . . .	42
4.4.5	Concentratie en $^{32}\text{P}$ -opname van ethanolamineplasmalogeen in lensdelen . . . . .	44
4.4.6	De $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de kalfslensfosfolipiden in vitro	45
4.4.7	De $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de fosfolipiden van de rattelens in vivo en in vitro . . . . .	46
4.5	Samenvatting . . . . .	49
	Literatuurreferenties . . . . .	50
5.	DE INVLOED VAN DE LEEFTIJD OP DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN MENSELIJKE EN DIERLIJKE LENZEN . . . . .	51
5.1	Inleiding . . . . .	51
5.2	Materialen en methoden . . . . .	51
5.2.1	Lensmateriaal . . . . .	51
5.2.2	Analytische technieken . . . . .	52
5.3	Resultaten en discussie . . . . .	52
5.3.1	De identiteit van de menselijke lensfosfolipiden . . . . .	52
5.3.2	De fosfolipidensamenstelling van de menselijke lens . . . . .	55
5.3.3	De fosfolipidensamenstelling van lensdelen . . . . .	60
5.3.4	Een vergelijking tussen de fosfolipidensamenstelling van menselijke en dierlijke lenzen . . . . .	62
5.4	Samenvatting . . . . .	63
	Literatuurreferenties . . . . .	63
6.	VERANDERINGEN IN MEMBRAANSAMENSTELLING EN FOSFOLIPIDENMETABOLISME IN CATARACTEUEZ LENZEN . . . . .	65
6.1	Inleiding . . . . .	65
6.2	Materialen en methoden . . . . .	65
6.3	Resultaten en discussie . . . . .	66
6.3.1	Membraanverandering in de cataracteuze lens . . . . .	66
6.3.2	Het fosfolipidenmetabolisme van menselijke en dierlijke cataracteuze lenzen . . . . .	68
6.4	Samenvatting . . . . .	72
	Literatuurreferenties . . . . .	72
7.	DE INOSITOLPERMEABILITEIT VAN DE CATARACTEUEZ LENS . . . . .	73
7.1	Inleiding . . . . .	73
7.2	Methoden . . . . .	73

7.3	Resultaten en discussie . . . . .	74
7.3.1	De hexitolen in de normale en de cataracteuze lens . . . . .	74
7.3.2	De opname van myo-inositol door de cataracteuze lens . . . . .	74
7.3.3	De efflux van myo-inositol uit de cataracteuze lens . . . . .	77
7.4	Samenvatting . . . . .	78
	Literatuurreferenties . . . . .	80
8.	DE BIOSYNTHESE VAN FOSFATIDYLINOSITOL IN DE NORMALE EN IN DE CATARACTEUZE LENS . . . . .	81
8.1	Inleiding . . . . .	81
8.2	Methoden . . . . .	81
8.2.1	Incubaties van lenzen met $^{32}\text{P}_1$ in cataractogene media . . . . .	81
8.2.2	Incubatie van cortexhomogenaat met $^{32}\text{P}_1$ . . . . .	82
8.2.3	De bereiding van een microsomenfractie uit lenscortex . . . . .	82
8.3	Resultaten en discussie . . . . .	82
8.3.1	De $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de fosfolipiden van de lenscortex in het prevacuolaire stadium . . . . .	82
8.3.2	De invloed van CTP op het incorporatiepatroon van $^{32}\text{P}$ in de cortexfosfolipiden . . . . .	84
8.3.3	Het fosfatidylinositolmetabolisme in cortexmicrosoomsystemen . . . . .	87
8.4	Samenvatting . . . . .	90
	Literatuurreferenties . . . . .	91
	SAMENVATTING . . . . .	92
	SUMMARY . . . . .	95

## AFKORTINGEN

ATP	adenosinetrifosfaat
CDP	cytidinedifosfaat
CMP	cytidinemonofosfaat
CTP	cytidinetrifosfaat
cpm	counts per minuut
DG	diglyceride
EDTA	ethyleendiamine-tetra-acetaat
GSH	glutathion
min.	minuut
P <sub>i</sub>	anorganisch fosfaat
PP <sub>i</sub>	anorganisch pyrofosfaat
spec. act.	specifieke activiteit
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethaan
v/g	volume-gewichtsverhouding
vol.	volume (of: volumina)



## INLEIDING

## I.1 DE LENS-LIPIDEN

I.1.1 *Historisch overzicht betreffende de lensfosfolipiden*

De beginperiode van het onderzoek betreffende de lensfosfolipiden wordt gekenmerkt door pogingen om deze klasse lipiden als geheel in handen te krijgen en het totale gehalte ervan in de lens te bepalen. De eerste publikatie van enige importantie over dit onderwerp verscheen in 1881 van de hand van Cahn<sup>1</sup>. Verscheidene onderzoekers herhaalden zijn bepalingen met uiteenlopende resultaten, hetgeen te wijten was aan het gebrek aan doeltreffende extractie- en zuiveringstechnieken.

Een periode van meer gedetailleerd onderzoek nam een aanvang met het werk van Salit en Krause. Salit<sup>2</sup> kwam omstreeks 1935 door analyse van honderden menselijke lenzen tot de conclusie, dat met het ouder worden van de lens het fosfolipidengehalte toenam. Deze onderzoeker was ook de eerste, die op grond van de toenmalige biochemische gegevens veronderstelde, dat 'lecithoproteinen' (d.w.z. fosfolipoproteinen) bestanddelen zouden zijn van het cytoplasma en de celwanden. Door bestudering van de menselijke lenzen met behulp van een spleetlamp-microscoop werden zij ingedeeld naar hun stadia van 'sclerose' en cataract. Het fosfolipidengehalte van de sclerotische lens en de cataract bleek af te nemen, wanneer het rijpe stadium bereikt was. In dit stadium trad een duidelijke autolyse op. Salit noemde vier redenen, waardoor vroegere onderzoekingen het tegendeel aantoonde: 1. veronachtzaming van de leeftijd; 2. gebrek aan onderscheid tussen intra- en extracapsulaire lenzen; 3. gebrekkige of ontbrekende klassificering van de lenzen naar hun cataractstadium; 4. verwisseling van de natuurlijke fosfolipiden met hun afbraakprodukten. Met deze opsomming karakteriseerde hij afdoende de stand van het lenslipidenonderzoek vóór die tijd. Een meer gedetailleerd overzicht omtrent deze periode treft men aan in 'Biologie du Cristallin' van J. Nordmann<sup>3</sup>.

De eerste fosfolipidenfracties werden door Krause in 1934 onderzocht<sup>4</sup>. De fosfolipiden, die 60% van alle lipiden zouden uitmaken, bevatten cefaline, lecithine en sfingomyeline. De percentages voor deze fracties stemmen echter niet overeen met die van latere onderzoekers. Een meer gedetailleerde analyse



werd in 1958 door Brolin<sup>5</sup> uitgevoerd. Met behulp van chromatografische technieken werden de volgende componenten in runderlenzen geïdentificeerd: sfingomyeline, fosfatidylcholine (lecithine), fosfatidylethanolamine, fosfatidylserine en plasmalogeën. In de 'cefaline' (ethanolamine- plus serine-fosfolipiden) plus 'lecithine'-fractie werd 40–50% plasmalogeën aangetroffen. Hierbij kan worden opgemerkt, dat deze lecithine-cefalinefractie sfingomyeline moet hebben bevat, dat zich als plasmalogeën gedraagt bij de gebruikte alkalische hydrolyse en hierdoor bij de meting werd betrokken. Aan de kwantitatieve resultaten van dit onderzoek mag men niet te veel waarde hechten, aangezien het relatief apolaire chloroform als extractiemiddel werd gebruikt. Voor een kwantitatieve opbrengst aan lipiden moet men herhaaldelijk met chloroform-methanol mengsels extraheren. Ook de resultaten van Tronche en Mandel<sup>6</sup> moeten kritisch bekeken worden, aangezien het hier een onderzoek van runderlenslipiden betreft, waarbij als fosfolipidenfractie het met aceton precipiteerbare deel genomen werd. Het is bekend, dat de opbrengst van deze precipitatie afhangt van de samenstelling van de fosfolipidenfractie<sup>7</sup>. Volgens dit onderzoek steeg het percentage fosfolipiden (% van het natgewicht) in de runderlens met de leeftijd, terwijl de kern steeds een lager percentage bevatte dan de cortex.

Een goede scheidingstechniek voor lipiden was tot dit tijdstip nog steeds niet beschikbaar. Door de ontwikkeling van de dunnelaagchromatografie op silicagel werd echter omstreeks 1960 een zeer grote vooruitgang geboekt. Na enkele jaren aanloopperiode bleek het mogelijk met deze techniek vrijwel alle lipiden zuiver in handen te krijgen, zij het soms in microgramhoeveelheden en vrijwel altijd zonder de individuele molecuulspecies te scheiden.

De in dit proefschrift beschreven resultaten zijn verkregen door toepassing van twee-dimensionale dunnelaag-chromatografie op silicagel, welke door een speciaal hiervoor ontwikkelde methode werd gezuiverd, terwijl 'zuurgraad' en silicaatgehalte van de laag werden gestandaardiseerd. Hierdoor konden o.a. enige voor de lens en voor de meeste andere weefsels nog onbekende fosfolipiden worden geïsoleerd en geanalyseerd.

In 1964 beschreef Feldman de kolomfractionering van de lenslipiden van het konijn, de mens en het rund<sup>8</sup>, terwijl een jaar later de resultaten werden gepubliceerd van een studie van de menselijke seniele cataract<sup>9</sup>. Hierbij werden de lipiden ingedeeld in de gebonden en de ongebonden vorm. Bij de groep van de cataracten bleek vooral de fosfolipidenfractie in de ongebonden vorm te zijn overgegaan, terwijl het totale lipidengehalte er van slechts weinig verschilde van de normale lenzen. Later, na de toepassing van de dunnelaagchromatografie, werd het mogelijk meer lipiden te scheiden. Een micro-analyse van 3 menselijke lenzen werd door Feldman in 1966 gepubliceerd<sup>10</sup>. Het sfingomyeline-gehalte bleek uitzonderlijk hoog. De leeftijd van deze lenzen was echter

niet bekend, zodat het leek alsof de menselijke lens in een uitzonderingspositie verkeerde door dit hoge gehalte. Uit het door ons gelijktijdig verrichte onderzoek kwam echter naar voren, dat de leeftijd een sterke invloed op de fosfolipidensamenstelling uitoefende<sup>11, 12, 13</sup> hetgeen ook door Feldman later werd bevestigd (persoonlijke mededeling). In het door ons verrichte onderzoek bleek ook de afhankelijkheid van de lipidensamenstelling van de diersoort, terwijl de aanwezigheid van een groot aantal andere fosfolipiden werd vastgesteld.

### *1.1.2 Het fosfolipidenmetabolisme van de lens*

Tot voor kort werd betwijfeld<sup>14, 15</sup> of de lens een lipidenmetabolisme zou hebben. Dit is verwonderlijk, omdat het niet duidelijk is, hoe groei zou moeten plaats vinden zonder lipiden synthese. Cellen hebben immers de verschillende lipiden nodig als structurele bestanddelen van hun membranen. De groei, die de lens gedurende het gehele leven aan zijn equatoriale zone vertoont, komt tot uiting in zijn voortdurend toenemend gewicht en volume. Men kan dus een de novo synthese van lipiden bij voorbaat waarschijnlijk achten.

Het feit, dat de lens niet gevasculariseerd is betekent, dat de voedingsbestanddelen en diverse bouwstoffen door het kamerwater moeten worden geleverd. Dit maakt het begrijpelijk, dat het actieve metabolisme en het groeimechanisme aan de buitenzijde van de lens, in epitheel en equator, worden aangetroffen. Met behulp van  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  konden wij op deze plaatsen een actieve fosfaat-inbouw in de meeste fosfolipiden aantonen. Het fosfolipidenmetabolisme in de lens behoefde niet noodzakelijk te verlopen als in andere, wel gevasculariseerde weefsels. Uit het in deze dissertatie beschreven onderzoek bleek echter, dat er duidelijke overeenkomsten aanwezig waren. Hiertoe werden de resultaten voor de lens vergeleken met die voor hersenen en lever<sup>11</sup>. Op grond van de bevindingen kan een overzichtsschema gegeven worden, dat, voor zover bekend, universeel geldt voor alle zoogdierweefsels (fig. 1.1 en 1.2). Meer details kan men vinden in recente overzichten van Dawson<sup>16</sup> en Masoro<sup>17</sup>.

### *1.1.3 De 'neutrale' lipiden en de glycolipiden*

In 1854 stelde von Graefe<sup>18</sup> voor de menselijke lens een hoog cholesterolgehalte vast. Sindsdien zijn omtrent het cholesterolgehalte van normale en cataracteuze lenzen vele tegenstrijdige resultaten in de literatuur verschenen. Deze werden in 1954 door Nordmann samengevat<sup>3</sup>. Feldman, die de extractiemethode met chloroform-methanol gebruikte, vond geen verschil tussen normale en cataracteuze menselijke lenzen, maar wel een duidelijke invloed van de leeftijd; n.l. een stijging van 10,2  $\mu\text{g}$  cholesterol per jaar per lens<sup>15</sup>. Deze invloed van de leeftijd werd reeds door vele auteurs voor menselijke en dierlijke

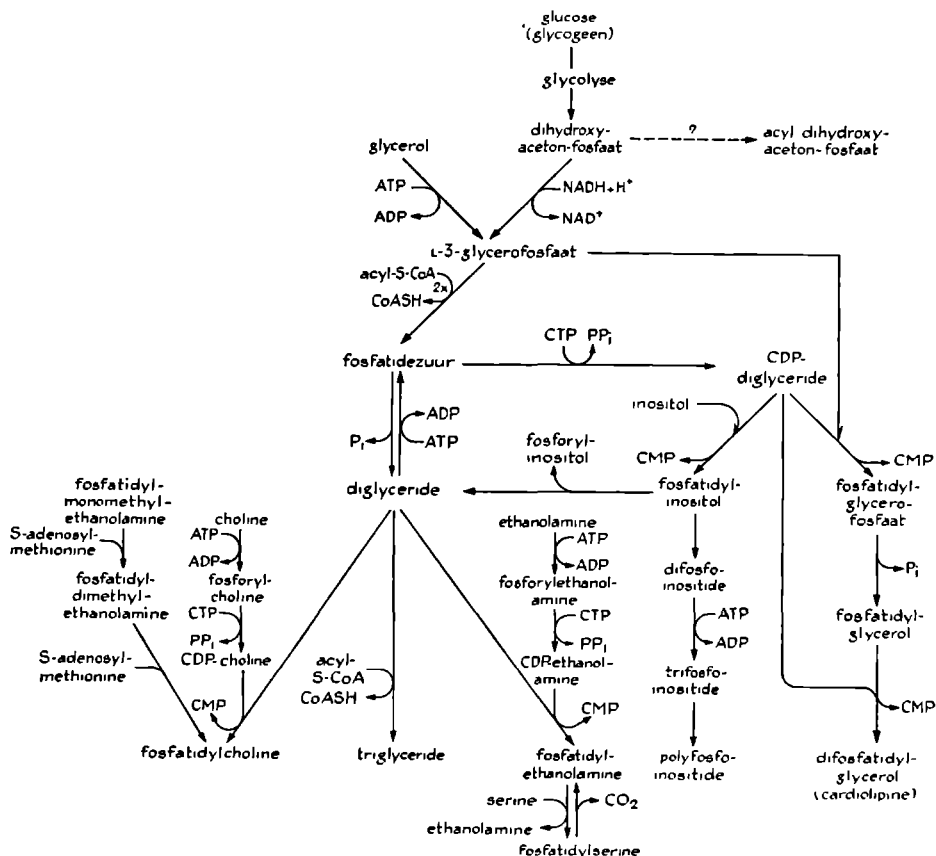
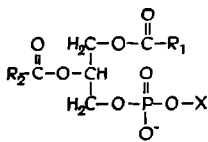


FIG. 1.1 De biosynthese van glyceriden

lenzen aangetoond<sup>3</sup>. Naast cholesterol bleken de triglyceriden de belangrijkste neutrale lipiden te zijn in de menselijke lens (ca. 175 µg/lens).

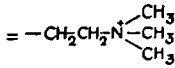
Gangliosiden werden voor het eerst in de kalfslens aangetoond door Brolin<sup>5</sup>, maar zij werden in onvoldoende mate geëxtraheerd, aangezien hiertoe alleen chloroform werd aangewend. In de menselijke lens werd een relatief hoog gangliosidegehalte gevonden (ca. 250 µg/lens)<sup>19</sup>. Cerebrosiden werden het eerst door Krause<sup>4</sup> en later door Brolin<sup>5</sup> aangetroffen in de runderlens in lage concentraties. Door middel van dunnelaagchromatografie konden de glycolipiden uit de menselijke lens door Feldman in vele fracties worden gescheiden<sup>19</sup>. Glucose en galactose waren hierin aanwezig in de verhouding 1:1. Zowel in de gangliosiden als in de cerebrosiden was dihydrosfingosine de belangrijkste base naast sfingosine.



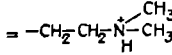
1,2 diacyl-sn-glycero-3-fosforyl-X (s fosfatidyl-X)

X = -H

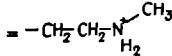
1,2 diacyl-sn glycero-3-fosforzuur (s fosfatidezuur)



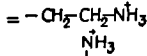
fosfatidylcholine (lecithine)



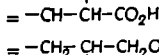
fosfatidyl(N-dimethyl)-ethanolamine



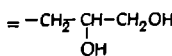
fosfatidyl(N-monomethyl)-ethanolamine



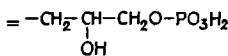
fosfatidylethanolamine



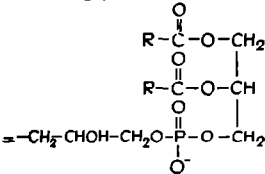
fosfatidylserine



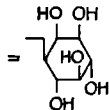
fosfatidylglycerol



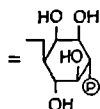
fosfatidylglycerofosfaat



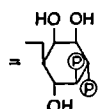
difosfatidylglycerol



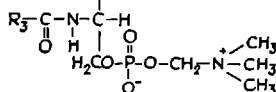
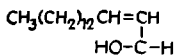
fosfatidylinositol (monofosfoinositide)



fosfatidylinoitol-4-fosfaat (difosfoinositide)



fosfatidylinoitol-4,5-difosfaat (trifosfoinositide)



sphingomyeline (N-acylsphingosylfosforylcholine)

FIG. 1.2 De structuur van de fosfolipiden.

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> en R<sub>3</sub> zijn koolwaterstofketens;  $\text{P}^+$  = fosfaat; in lysofosfolipiden is R<sub>1</sub>-C- vervangen

door H-; in vinyl-ether-fosfolipiden (plasmalogenen) is R<sub>1</sub>-C- vervangen door R<sub>1</sub>-CH=CH-;

in alkoxy-fosfolipiden (glycerylether-fosfolipiden) is R<sub>1</sub>-C- vervangen door R<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>-.

### 1.1.4 *De vetzuursamenstelling van de lenslipiden*

De vetzuursamenstelling van de triglyceriden van de menselijke lens werd gedeeltelijk geanalyseerd<sup>20, 21</sup>. 85 % van deze klasse lipiden bestond uit moleculen met 48, 50 en 52 koolstofatomen. De belangrijkste vetzuren waren palmitinezuur, stearinezuur en linolzuur. In de menselijke lensfosfolipiden kwam ongewoon veel palmitinezuur voor (33–52 %)⁸, een vetzuur, dat naast nervonzuur ook een belangrijk bestanddeel is van de lensgangliosiden<sup>19</sup> en de triglyceriden<sup>21</sup>. Het vetzuurspectrum van dierlijke lenslipiden werd door meerdere onderzoekers geanalyseerd<sup>8, 22, 23</sup>, zonder dat opvallende verschillen met andere weefsels werden gevonden.

## 1.2 ENERGIEMETABOLISME EN TRANSPORT IN DE LENS

### 1.2.1 *Het energiemetabolisme*

Glucose is de belangrijkste bron van energie voor de lens. Het wordt door het kamerwater aangevoerd en door het epitheel actief inwaards getransporteerd, waarna ongeveer 86 % door de glycolyse, ongeveer 14 % door de hexosemonofosfaat-shunt en een zeer gering deel door de citroenzuurcyclus wordt omgezet<sup>24</sup> (Fig. 1.3). Dit laatste is begrijpelijk, aangezien de zuurstoftoevoer gering is, terwijl slechts epitheel en perifere cortex voldoende mitochondriën bevatten voor de oxidatieve fosforylering. Glucose kan ook worden omgezet in sorbitol, dat op zijn beurt weer tot fructose wordt geoxydeerd<sup>14</sup>. Fructose kan door fosforylering als fructose-6-fosfaat in de glycolyse worden ingevoerd, maar hiervoor zijn relatief hoge fructoseconcentraties nodig. Het glucosemetabolisme wordt hierdoor niet verstoord<sup>26</sup>. Bij de omzetting van glucose is hexokinase het beperkende enzym<sup>27</sup>. Het wordt geremd door glucose-6-fosfaat en bezit normaal slechts 50 % van zijn maximale activiteit.

Het enzym aldose reductase, dat glucose in sorbitol en galactose in galactitol kan omzetten, neemt de laatste jaren een belangrijke plaats in bij de studie van de suikercataracten (zie 1.3). De bij deze reactie benodigde NADPH wordt door de hexosemonofosfaat-shunt geleverd (Fig. 1.3). Behalve melkzuur schijnt ook  $\alpha$ -glycerofosfaat een eindproduct van het metabolisme te zijn. Het wordt door reductie van dihydroxy-acetonfosfaat uit de glycolyse gevormd. Het kan echter door de omgekeerde reactie, die in de mitochondriën plaats vindt, NADH leveren. Men kan dus van een  $\alpha$ -glycerofosfaatcyclus spreken<sup>27</sup> (Fig. 1.3).

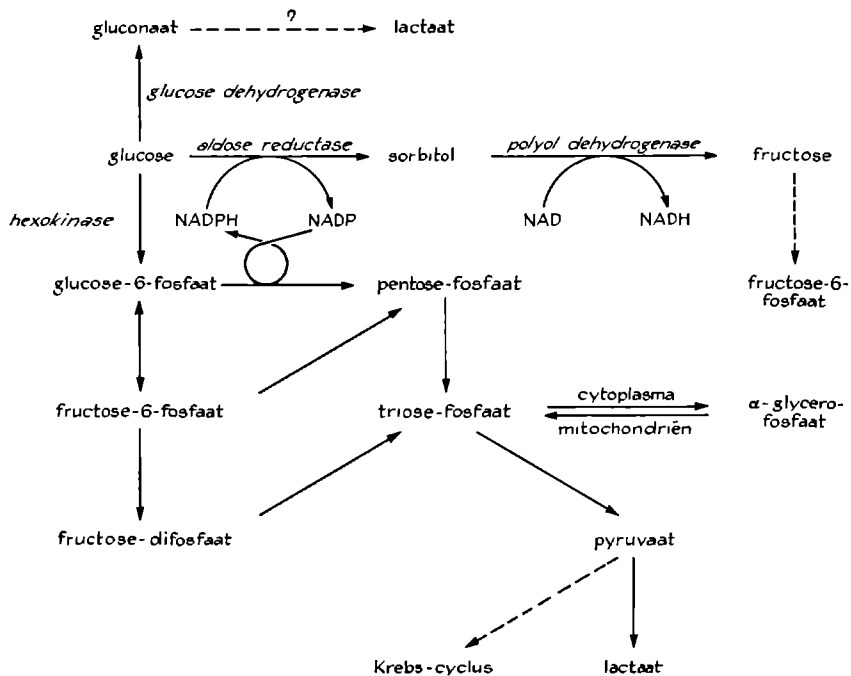


FIG. 1.3 Het glucosemetabolisme in de normale lens.  
De vorming van lactaat uit gluconaat is niet met zekerheid vastgesteld.  
De Krebs-cyclus oxideert slechts zeer geringe hoeveelheden pyruvaat.  
Fructose wordt alleen bij overmaat als substraat gebruikt.  
Verdere bijzonderheden: zie tekst.

### 1.2.2 Het actief transport in de lens

Glucose wordt door het lensepitheel actief inwaards getransporteerd<sup>28</sup>. Dit transport kan een beperkende factor zijn bij het glucoseverbruik. Ook aminozuren<sup>29</sup> en  $K^+$  worden actief getransporteerd, terwijl  $Na^+$  naar buiten wordt gevoerd. De benodigde  $Na^+/K^+$ -ATPase activiteit is vrijwel geheel in het epitheel gelokaliseerd<sup>30</sup>. Bij verlaging van temperatuur wordt de intracellulaire  $Na^+/K^+$ -verhouding in de lens verstoord. Deze verhouding herstelt zich<sup>31</sup> door incubatie met glucose bij  $37^\circ$ . In aanwezigheid van glucose is zuurstof hiervoor niet nodig. Andere omstandigheden, die de  $Na^+/K^+$ -verhouding verstoren, zijn de aanwezigheid van remmers van de  $Na/K$ -ATPase activiteit, zoals ouabaine en hoge concentraties (30 mM) galactose en glucose in het voedingsmedium in vitro of in vivo. Fructose (30 mM) geeft dit effect niet<sup>31</sup> en wordt daarom in controlemedia gebruikt.

Het kationentransport wordt eveneens geremd door joodazijnzuur, fluoride,

cyanide, dinitrofenol, methyleenblauw en bepaalde steroiden (prednisolon, triamcinolon)<sup>31</sup>. Het actief inositoltransport wordt in dit proefschrift beschreven in samenhang met de remming van dit transport in de experimentele suikercataract.

### 1.3 DE SUIKERCATARACT

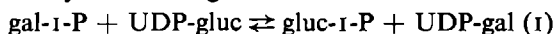
#### 1.3.1 *De diabetische cataract*

Bij de mens komt de diabetische cataract vooral voor bij personen tussen de 3 en de 30 jaar<sup>32</sup>. Dit is te wijten aan een groter aantal latente gevallen van diabetes op jeugdige leeftijd, gecombineerd met het feit, dat de jonge lens gevoeliger is voor hoge suikerconcentraties. Er bestond geruime tijd een controverse omtrent een eerder ontstaan en een veelvuldiger voorkomen van seniele cataracten bij oudere diabeten<sup>32</sup> dan bij niet-diabeten. Een recent onderzoek, ingesteld door Pirie<sup>33</sup>, wees uit, dat extractie van een seniele cataract 4-6 maal meer voorkomt bij diabetici boven de 50 jaar dan bij niet-diabetici.

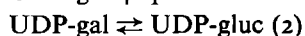
De oorzaak van de diabetische cataract wordt sinds lang onderzocht bij proefdieren na pancreatetectomie of na injectie met alloxaan. Beide ingrepen stellen de insuline producerende bèta-cellen van de pancreas buiten werking. De glucosespiegel in bloed, kamerwater en lens stijgt bij deze dieren, waardoor de concentraties van lensorbitol en fructose eveneens stijgen. De sorbitolvorming is te danken aan de lage hexokinase, de relatief hoge aldose reductase en de hoge hexosemonofosfaat-shunt activiteiten<sup>27</sup> (zie Fig. 1.3). Men neemt aan, dat de sterk stijgende sorbitolspiegel<sup>34</sup> de osmotische waarde van het celvocht zodanig verhoogt, dat water naar binnen beweegt om deze waarde te normaliseren. Hierdoor ontstaan steeds meer en steeds grotere vacuolen, terwijl later degeneratie van de vezels optreedt. Dit inzicht is in het bijzonder tot stand gekomen door de onderzoeken van Kinoshita omtrent de galactosecataract. De biochemische veranderingen van de lens bij de diabetische cataract lopen grotendeels parallel aan die bij de galactosecataract (1.3.2). Een opvallend verschil is echter, dat het tempo van de ontwikkeling van de diabetische cataract veel langzamer is bij gelijke bloedsuikerspiegels. Dit komt doordat galactitol, in tegenstelling tot sorbitol, een eindproduct is en daardoor sneller accumuleert. Bij tijdige toediening van insuline blijkt de diabetische cataract reversibel te zijn. Om de aangetaste vezellaag vormen zich nieuwe cellen. In vitro heeft men geen effect van insuline kunnen aantonen op de glucoseopname van normale lenzen of van lenzen van diabetische dieren<sup>32</sup>. Het is dus waarschijnlijk, dat insuline in dit geval uitsluitend werkt door middel van de verlaging van de bloedsuikerspiegel.

### 1.3.2 De galactosecataract

De galactosecataract wordt aangetroffen bij patiënten met galactosemie. Dit is een erfelijke ziekte, die veroorzaakt wordt door afwezigheid (van de activiteit) van het enzym galactose-1-fosfaat uridyltransferase. Dit enzym katalyseert de volgende reactie:

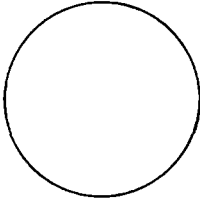


Het galactose wordt vervolgens in glucose omgezet door middel van het enzym UDP-gal-4-epimerase:

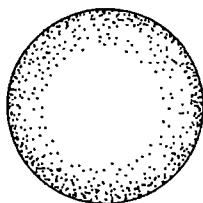


Bij galactosemie vindt men een accumulatie van galactose-1-fosfaat in het lichaam (erythrocyten, lever, lens), doordat reactie (1) ontbreekt. Aangezien deze stof het enzym galactokinase remt, wordt de verdere fosforylering van galactose bemoeilijkt. De resulterende hoge galactosespiegel in het bloed leidt tot een lenstroebling<sup>35</sup>. Experimenteel kan men een dergelijke troebeling opwekken door proefdieren een dieet te geven, voor 30–50% bestaande uit galactose of door lenzen te incuberen in een galactosehoudend medium. Vooral dank zij het werk van Kinoshita<sup>35</sup> heeft men een dieper inzicht gekregen in de ontwikkeling van de galactosecataract. Bij galactosemie krijgt de lens een overmaat galactose aangeboden via het kamerwater. Het in de lens zeer actieve enzym aldose reductase zet het galactose om in galactitol (Fig. 1.3), dat niet verder gemetaboliseerd kan worden. De accumulatie van galactitol veroorzaakt volgens Kinoshita een verhoogde osmotische waarde van het celvocht, waardoor water de lens binnenstroomt. Hierdoor ontstaan vacuolen, die het eerst zichtbaar worden in de equatoriale cortex, juist onder het kapsel<sup>36</sup>.

FIG. 1.4 De ontwikkeling van de galactosecataract.

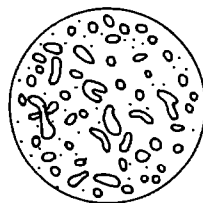
Cataract stadium	Biochemische en histologische veranderingen (ontleend aan Kinoshita <sup>35</sup> voorzover niet anders aangegeven)
 <p>Prevacuolaire stadium 1e–2e dag</p>	<p>Galactitolconcentratie stijgt sterk. Watergehalte neemt toe, zonder dat zouten penetreren. ATP-concentratie constant<sup>37</sup>. Na<sup>+</sup>- en K<sup>+</sup>-concentratie constant (t.o.v. drooggewicht). K<sup>+</sup>-uitwisseling neemt toe<sup>38</sup>. Actieve opname van aminozuren daalt<sup>39, 40</sup>. GSH-concentratie daalt<sup>37, 41</sup>. Glucose metabolisme onveranderd. Ophthalmoscopisch en microscopisch geen verandering waarneembaar<sup>41</sup>. Celdeling in epitheel sterk toegenomen<sup>42</sup>. Dit stadium wordt bereikt na een dag lensincubatie in 30 mM galactose of 50% galactose in het voedsel.</p>





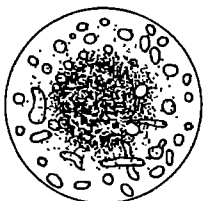
Stadium 1  
(2e-5e dag)

Galactitolconcentratie stijgt sterk.  
Watergehalte neemt toe, evenredig met het galactitolgehalte.  
 $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -concentratie constant.  
 $\text{Na}^+$ -concentratie stijgt,  $\text{K}^+$ -concentratie daalt.  
ATP-concentratie daalt.  
Galactose-1-fosfaat-concentratie stijgt<sup>43</sup> (ook: ref. 32, p. 111).  
Hexosemonofosfaat-shunt activiteit daalt (speciaal glucose-6-fosfaat dehydrogenase-activiteit).  
NADPH-concentratie daalt (NADH:NAD-verhouding constant).  
GSH-concentratie daalt<sup>37, 41</sup>.  
Glycolyse onveranderd<sup>32</sup>.  
Vele kleine intracellulaire vacuolen in equatoriale zone van de cortex<sup>36</sup>.  
Celdeling in epitheel daalt tot beneden normaal<sup>42</sup>.



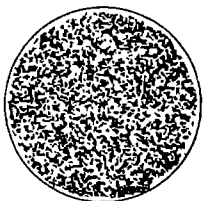
Stadium 2  
(2e week)

Veranderingen als in stadium 1, maar ernstiger.  
 $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -concentratie stijgt.  
 $\text{Cl}^-$ -concentratie stijgt.  
Eiwitsynthese vermindert.  
Galactitol en kleine eiwitmolekulen beginnen langzaam naar buiten te lekken.  
Vacuolen ontstaan ook in diepere lagen en vloeien vervolgens samen tot grotere.



Stadium 3  
(3e week)

Voortzetting van de veranderingen van stadium 2.  
 $\text{Na}^+$ - en  $\text{Cl}^-$ -concentraties stijgen sterk.  
ATP- en GSH-concentraties dalen sterk.  
Plotseling sterk toegenomen permeabiliteit.  
Galactitol en eiwit lekken naar buiten.  
Membraandestructie.  
Kerncataract (wit).



Stadium 4  
(4e week)

Totale cataract.  
ATP-concentratie ca. 5-10% van normaal.  
Andere afwijkingen als in de vorige stadia.

Direct bij de aanvang van het zwellen van de lens neemt men veranderingen waar in het actief transport van verschillende stoffen (Fig. 1.4). Bij de ontwikkeling van de experimentele galactosecataract ziet men op de tweede of de derde dag een ringvormige troebeling verschijnen in de perifere cortex (Fig. 1.4). Bij voortgaande galactosetoevoer breidt de troebeling zich uit, totdat de totale lens ondoorzichtig is door de vacuolen. Tenslotte vloeien vele vacuolen in elkaar over, een stadium waarin membraandestructie histologisch wordt waargenomen, terwijl een plotselinge sterke toename van de membraanpermeabiliteit chemisch kan worden aangetoond. In dit stadium ontstaat ook een witte kerncataract, die zich later uitbreidt tot de gehele lens (stadium 4). De verschijnselen tijdens het prevacuolaire stadium van de galactosecataract (Fig. 1.4) zijn het belangrijkste, aangezien men hier vermoedelijk de oorzaak van de cataract kan opsporen. De latere verstoringen zijn grover en zijn slechts onderdelen van een steeds verder om zich heen grijpende metabolische disregulatie, die in het prevacuolaire stadium werd ingezet.

Men heeft veel gespeculeerd over de oorzaken van de verschijnselen in het prevacuolaire stadium. De hoge galactoseconcentratie zou het glucosemetabolisme kunnen verstoren, maar men vond geen veranderde lactaatproductie of glucosverbruik. Belangrijk was de ontdekking, dat het ATP-gehalte in dit stadium slechts weinig veranderde of zelfs constant bleef tot de eerste troebelingen optraden. Daarom is gebrek aan energie zeer waarschijnlijk niet de factor, die de cataractontwikkeling initieert<sup>35</sup>. Het onderzoek van de laatste jaren heeft de hypothese van Kinoshita, welke hierboven werd beschreven, verder gesteund: bij zwelling van de lens in hypotone media vindt men een permeabiliteitsverandering voor  $K^+$ , welke sterk lijkt op die bij de suikercataract<sup>38</sup>; verhindert men de osmotische zwelling van de lens door verhoging van de osmotische waarde van het galactosehoudend medium, dan treden geen permeabiliteitsveranderingen op, hoewel galactitol wel accumuleert<sup>38</sup>; voegt men een specifieke aldose reductase-remmer toe aan het medium, dan wordt weinig galactitol gevormd en blijft de lens in vrijwel normale conditie<sup>45</sup>. Opmerkelijk is de gevoeligheid van de jonge lens voor hoge aldoseconcentraties. Men schrijft dit toe aan de relatief hoge activiteit van de hexosemonofosfaat-shunt in jonge lenzen, waardoor het voor polyolvorming benodigde NADPH sneller gevormd wordt. In oude lenzen kan de shuntactiviteit tien maal lager zijn<sup>32</sup>.

### 1.3.3 *De ultrastructuur van de galactosecataract*

In een zeer recent verschenen publicatie van Kuwabara, Kinoshita en Cogan<sup>47</sup> wordt de ultrastructuur van de galactosecataract beschreven. Na 3 dagen galactosevoeding (Fig. 1.4, het begin van stadium 1) ontstonden kleine vacuolen

in de equatoriale cortex, welke na verwijderen van de galactose uit het dieet reversibel bleken. De vroege afwijkingen in de ultrastructuur werden gevonden in het lensepitheel en in de oppervlakkig gelegen cortextlagen bij de kernboog. De intercellulaire ruimten in het epitheel bleken verwijd te zijn. Sommige cellen waren oedematisch en hun uiteinden drongen vaak door tot in de aangrenzende cortex. In veel cellen was het aantal vrije en membraangebonden ribosomen toegenomen. Dit suggereerde een toegenomen metabolische activiteit. Het cellulaire pompmechanisme scheen hyperactief te zijn, in een poging de toegenomen permeabiliteit voor kationen te corrigeren<sup>38</sup>. De opvallende zwelling van de corticale lenscellen langs het kapsel, zowel aan de voorzijde als aan de achterzijde, biedt volgens de auteurs een mogelijke verklaring voor de toegenomen permeabiliteit voor kationen en aminozuren<sup>47</sup>.

In dit stadium viel de intercellulaire cystenvorming op in de buitenste cortextlagen van de equator en de voorzijde van de lens. Hierbij werden de tight junctions behouden. Vele cysten bevatten een eiwitachtige substantie. De cortexcellen werden onregelmatig van vorm en dichtheid en er bleken vele vacuolen gevormd te zijn. De cellen bleken echter niet ernstig beschadigd te zijn in dit stadium. De korrelstructuur was grover dan normaal, vooral aan de voorzijde van de lens.

De elektronenmicroscopische gegevens verschillen enigszins van die van Friedenwald en Rytel, welke verkregen werden door middel van lichtmicroscopie<sup>36</sup>. Zij vonden, dat de accumulatie van vloeistof intracellulair was en niet extracellulair. Uit het onderzoek van Kuwabara en medewerkers echter blijkt, dat de cellen weliswaar zwellen en vacuolen bevatten, maar dat een opvallende trek van dit vroege stadium de extracellulaire ligging van cysten is. Deze zijn vooral talrijk in de kernboog en aan de achterkant van de lens. Zij zouden kunnen ontstaan door de pogingen van de lenscellen om de overmaat water te verwijderen. Zij worden door de tight junctions in hun omvang beperkt, waardoor de waargenomen 'vloeistofdruppels' ontstaan. In veel van de cysten werden onregelmatigheden van de celwand waargenomen, welke breuken zouden kunnen zijn.

#### 1.4 DOEL VAN HET ONDERZOEK

Het doel van het in deze dissertatie beschreven onderzoek was de bestudering van:

- a. de indenteit van de fosfolipiden in de afzonderlijke oogweefsels, met speciale aandacht voor de lens;
- b. de fosfolipidensamenstelling van de verschillende oogweefsels met behulp van technieken, die voor dit doel werden ontwikkeld;

- c. de samenstelling en het metabolisme van de lensfosfolipiden in verband met leeftijd en soort, met speciale aandacht voor de ouder wordende menselijke lens;
- d. de samenstelling en het metabolisme van de fosfolipiden van menselijke en dierlijke lenzen en van lensdelen in de normale en de cataracteuze toestand.

#### LITERATUURREFERENTIES

1. A. CAHN, *Z. Physiol. Chem.*, 5 (1881), 213.
2. P. W. SALIT, *Arch. Ophthalmol.*, 16 (1936) 271.
3. J. NORDMANN, *Biologie du Cristallin*, Masson, Parijs, 1954.
4. A. C. KRAUSE, *The Biochemistry of the Eye*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1934.
5. S. E. BROLIN, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 110.
6. P. TRONCHE en P. MANDEL, *Concilium Ophthalmologicum Belgica*, Acta, Vol. I (1958) 699.
7. G. B. ANSELL en J. N. HAWTHORNE, *Phospholipids*, B.B.A. Library, Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 43.
8. G. L. FELDMAN, T. W. CULP, L. S. FELDMAN, C. K. GRANTHAM en H. T. J. JONSSON, *Invest. Ophthalmol.*, 3 (1964) 194.
9. G. L. FELDMAN en L. S. FELDMAN, *Invest. Ophthalmol.*, 4 (1965) 162.
10. G. L. FELDMAN, L. S. FELDMAN en G. ROUSER, *Lipids*, 1 (1966) 161.
11. R. M. BROEKHUYSE en J. H. VEERKAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 316.
12. R. M. BROEKHUYSE, Symposium on the Biochemistry of the Eye (1968), samengevat in *Exp. Eye Res.*, 8 (1969) 227.
13. R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 187 (1969), ter perse.
14. R. VAN HEYNINGEN, in *The Eye*, ed. H. Davson, Academic Press, London, 1962, Vol. I, p. 243.
15. G. L. FELDMAN, in *Biochemistry of the Eye*, Symp. Tutzing Castle, 1966, ed. M. U. Dardenne en J. Nordmann, S. Karger, Basel, 1968, p. 348.
16. R. M. C. DAWSON, in *Essays in Biochemistry*, Vol. 2, ed. P. N. Campbell en G. D. Greville, Academic Press, London, 1966, p. 69.
17. E. J. MASORO, *Physiological Chemistry of Lipids in Mammals*, Saunders Comp., London, 1968.
18. A. VON GRAEFE, *Arch. Ophthalmol.*, 1 (1854) 323.
19. G. L. FELDMAN, L. S. FELDMAN, en G. ROUSER, *Lipids*, 1 (1966) 21.
20. G. L. FELDMAN en L. S. FELDMAN, *Lipids*, 1 (1966) 86.
21. T. W. CULP, C. R. CREGER, A. A. SWANSON, T. M. FERGUSON en J. R. COUCH, *Exp. Eye Res.*, 6 (1967) 33.
22. W. BARTLEY, R. VAN HEYNINGEN, B. M. NOTTON en A. RENSHAW, *Biochem. J.*, 85 (1962) 332.
23. E. TURCHETTO, M. SOLA en G. LENAZ, *Exp. Eye Res.*, 2 (1963) 160.
24. J. H. KINOSHITA en C. WACHTL, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 5.
25. R. VAN HEYNINGEN, in *The Eye*, ed. H. Davson, Academic Press, London, 1962, Vol. I, p. 227.
26. C. WACHTL en V. E. KINSEY, *Am. J. Ophthalmol.*, 44 (1957) 318.
27. J. H. KINOSHITA, *Invest. Ophthalmol.*, 4 (1965) 619.
28. J. W. PATTERSON, *Invest. Ophthalmol.*, 4 (1965) 667.
29. V. E. KINSEY, *Invest. Ophthalmol.*, 4 (1965) 691.
30. S. L. BONTING, *Invest. Ophthalmol.*, 4 (1965) 723.

32. J. E. HARRIS en B. BECKER, Invest. Ophthalmol., 4 (1965) 709.
32. S. LERMAN, *Cataracts*, C. C. Thomas, Springfield, 1964.
33. A. PIRIE, Invest. Ophthalmol., 4 (1965) 629.
34. R. VAN HEYNINGEN, Exp. Eye Res., 1 (1962) 396.
35. J. H. KINOSHITA, Invest. Ophthalmol., 4 (1965) 786.
36. J. S. FRIEDENWALD en D. RYTEL, Arch. Ophthalmol., 53 (1955) 825.
37. T. O. SIPPEL, Invest. Ophthalmol., 5 (1966) 568, 576.
38. J. H. KINOSHITA, L. O. MEROLA en B. TUNG, Exp. Eye Res., 7 (1968) 80.
39. E. COTLIER en C. BEAUTY, Invest. Ophthalmol., 7 (1968) 77
40. D. V. N. REDDY, Invest. Ophthalmol., 4 (1965) 700.
41. S. R. GIFFORD en J. BELLOW, Arch. Ophthalmol., 21 (1939) 346.
42. L. VON SALLMAN, Am. J. Ophthalmol., 44 (1957) 159.
43. V. SCHWARZ en L. GOLBERG, Biochim. Biophys. Acta, 18 (1955) 310.
44. S. LERMAN en S. ZIGMAN, Invest. Ophthalmol., 4 (1965) 643.
45. J. H. KINOSHITA, D. DVORNIK, M. KRAML en K. H. GABBAY, Biochim. Biophys. Acta, 158 (1968) 472.
46. R. GITZELMANN, H. C. CURTIUS en J. SCHNELLER, Exp. Eye Res., 6 (1967) 1.
47. T. KUWABARA, J. H. KINOSHITA en D. G. COGAN, Invest. Ophthalmol., 8 (1969) 133.

## MATERIALEN EN METHODEN

## 2.1 PROEFDIEREN \*

Wistar ratten van 65-75 g werden gevoed met het Rat-Mouse-Hamster dieet van Hope Farms, Woerden, Nederland.

## 2.2 CATARACTEN, OPGEWEKT IN VIVO \*

Voor het opwekken van galactosecataracten werd 40 gew. % van het voedsel vervangen door galactose<sup>1</sup>. Voor controledieren werd sucrose in plaats van galactose gebruikt. Diabetes werd opgewekt door twee subcutane injecties van 147 mg/kg alloxantetrahydraat in citraatbuffer (pH 4,0) met een interval van 24 uur<sup>2</sup>. De ontwikkeling van de cataracten werd gevolgd door observatie met behulp van een handspleetlamp. Hierbij werd de pupil verwijdd door het oog te druppelen met Mydriaticum (Chibret) 1:10 verdund met 0,9% NaCl.

## 2.3 OOGWEEFSELS

Ogen van kalveren van 2-3 maanden oud werden onmiddellijk na de dood gekoeld, binnen twee uur van het abattoir naar het laboratorium gebracht en onmiddellijk gebruikt. De cornea werd met een scheermesje langs de limbus ingesneden en zo volledig mogelijk met een schaartje met kromme punten verwijderd. De iris werd vervolgens met een pincet weggescheurd. De vrijgekomen zonulavezels konden zo worden bereikt en doorgeknipt. De lens werd vervolgens voorzichtig uit het oog gedrukt, van het glasvocht losgeknipt langs het lenskapsel en opgevangen in een vaatje met medium van kamertemperatuur. Het oog werd nu in twee helften geknipt in de richting van de nervus opticus, welke werd verwijderd. Glasachtig lichaam, retina, choroidea, corpus ciliare en sclera konden hierna gemakkelijk van elkaar worden losgemaakt en worden bevrijd van vreemde weefselresten. Na spoelen met fysiologische zoutoplossing en afvloeien van overtollig vocht, werd het natgewicht bepaald.

Rattelenzen werden verkregen door de sclera aan de achterzijde zeer voorzichtig in te snijden en daarna open te knippen, zodat de lens door een geringe druk uit het oog kon worden verwijderd. Door zacht rollen op een nat gaasje

\* Wij zijn de heer J. W. Reitsma dankbaar voor zijn deskundige assistentie bij dit werk.

werd aanhangend glasvocht verwijderd. Indien nodig werden de lenzen onder aseptische omstandigheden uit het oog verwijderd. Er werd voor gezorgd het epitheel niet te raken. Voor dit werk bleek het noodzakelijk glad gepolijste pincetten te gebruiken en de lens niet langer dan een halve minuut aan de lucht bloot te stellen. De lenzen werden na afvloeien gewogen in een vaatje met medium.

## 2.4 EXTRACTIE VAN LENS-LIPIDEN

Voor de extractie van lenslipiden werden mengsels van chloroform en methanol gebruikt in de verhouding 1:1, 3:2 en/of 2:1 (ref. 3), afhankelijk van het doel van het onderzoek. Na extractie werd de chloroform-methanol-verhouding op 2:1 gebracht en wassing A toegepast door toevoegen van 0,2 volume 0,1 M KCl (ref. 3) schudden, centrifugeren en afpipetteren van de water-methanol-laag (bovenfase). Een nagenoeg volledige verwijdering van deze fase werd bereikt door de laatste resten met wat onderfase in een pipet met fijne punt (voorzien van een Peleusballon) op te zuigen en de afgescheiden onderfase uit de pipet terug te laten lopen in de buis. In sommige gevallen werd hierna wassing B uitgevoerd door aan de onderfase een gelijk volume synthetische bovenfase toe te voegen (chloroform-methanol-0,1 M KCl, 3:48:47) en bovenstaande fasenscheiding te herhalen.

De chloroformfase werd geconcentreerd en drie maal met behulp van absolute ethanol drooggedampt om water te verwijderen en eiwit uit proteolipiden af te splitsen en te denatureren. Een op de glaswand afgezette eiwitkorst werd, in koude vloeistof, door zwenken met glaskralen losgemaakt en afgecentrifugeerd (chloroform-methanol-verhouding maximaal 3:2) of door drukfiltratie verwijderd (microglasfilter, G3). Kwantitatieve resultaten konden worden bereikt door het glaswerk na overpipetteren van een extract driemaal na te spoelen met chloroform-methanolemengsels (1:1 en 2:1).

Oxidatie werd voorkomen door toevoeging van 5 mg/100 ml BHT (butylated hydroxytoluene) aan het extractiemiddel<sup>4</sup> en het gebruik van een stikstof-atmosfeer boven lipidenpreparaten bij microanalytisch werk. Andere voorzorgen om verandering van de lipiden te voorkomen waren: concentreren van extracten in vacuüm bij temperaturen beneden de 37°, beperking van de contacttijd tussen een droge lipidenfilm en glas, afschermen van direct daglicht, voorkomen van contact met zure of alkalische vloeistoffen, beperking van het contact met waterige wasvloeistoffen en bewaren van extracten bij -25° in benzeen-ethanol (4:1)<sup>5</sup>. Polyfosfoinositiden werden na toepassing van de bovenbeschreven procedures geëxtraheerd met chloroform-methanol-HCl volgens Dawson en Eichberg<sup>6</sup>.

## 2.5 KWANTITATIEVE DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE VAN INTACTE FOSFOLIPIDEN \*

Silicagel H werd als volgt gezuiverd: 1 kg werd vermengd met chloroform-methanol-geconc. HCl (5:5:1) en in een glazen kolom gegoten. Deze kolom (10 x 80 cm) was voorzien van een afneembaar glasfilter (afgedekt met glasvezelpapier) en een kraan. Ongeveer twee liter van deze vloeistof was nodig om een gele verontreiniging te elueren. Vervolgens werd het gel gewassen met 2 liter methanol en ca. 4 liter ammonia-water (1:3) tot een bruine band werd geëluëerd. De ammonia werd grotendeels verwijderd door de silicagel herhaald te roeren met porties gedistilleerd water (totaal 5 liter) en na sedimenteren te decanteren. Het materiaal werd gedurende 16 uur bij 150° gedroogd. De pH van 2 g gel in 20 ml water bleek voor een effectieve chromatografische procedure bij ca. 7 te moeten liggen. De gezuiverde silicagel (30 g), waaraan 1 of 2% alkalische magnesiumsilicaat was toegevoegd, werd gedurende 30 sec. met 60 ml water gemengd in een Waring Blendor (semi-microbeker). Met dit homogenaat (pH 8,0-8,4) werden vijf 20 x 20 cm glasplaten voorzien van een 0,25-0,30 cm dikke laag. Na 1 uur drogen aan de lucht, werden de platen 1,5 uur op 130° gedroogd en boven gec. zwavelzuur in vacuum bewaard. Hierbij trad geen verlies aan activiteit op. De chromatografie-bakken werden bekleed met filtreerpapier en een half uur geëquilibreerd met loopvloeistof I voor de eerste dimensie (chloroform-methanol- 7 M ammonia, 90:45:11) en loopvloeistof II voor de tweede dimensie (chloroform-methanol-azijnzuur-water, 90:40:12:2). Na ontwikkelen in de eerste dimensie, werd de plaat 15 min. gedroogd in de zuurkast. Indien de relatieve luchtvochtigheid groter was dan 60%, werden betere resultaten verkregen door een half uur drogen in hoog vacuum boven gec. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Vervolgens werd de plaat ontwikkeld in de tweede dimensie en na drogen gekleurd met behulp van jodiumdamp of hieronder beschreven reagentia (2.7). Toepassing, resultaten en theoretische beschouwing van de hier beschreven chromatografische techniek zullen in 3.3.1 worden gegeven.

## 2.6 KWANTITATIEVE DUNNELAAG-CHROMATOGRAFIE VAN PLASMALOGENEN \*

Voor plasmalogenbepalingen werden de lipidenextracten gechromatografeerd op silicagellagen met 1% alkalische magnesiumsilicaat. Na ontwikkelen in de eerste dimensie met chloroform-methanol-ammonia (75:34:6) en drogen, werd het lipiden spoor nat gespoten met 5 mM HgCl<sub>2</sub> in 0,1 M azijnzuur, terwijl de rest van de plaat werd afgeschermd. Door Hg<sup>2+</sup>-ionen wordt de afsplitsing

\* Wij danken de heer M. G. J. Buys voor zijn assistentie bij dit deel van het onderzoek.



van vetaldehyden van plasmalogenen gekatalyseerd, waardoor lysofosfolipiden ontstaan. Het azijnzuur werd toegevoegd om de binding van  $\text{Hg}^{2+}$  aan de aanwezige alkalische componenten te verhinderen. De  $\text{H}^+$ -concentratie werd echter zó laag gekozen, dat geen vetzuren konden worden afgesplitst. Na 30 min. drogen in vacuüm werden de reactieproducten in de tweede dimensie gescheiden door chloroform-methanol-azijnzuur-water (75:25:8:3). Deze methodiek, een modificatie van die van Owens, werd volgens de werkwijze van deze auteur<sup>7</sup> gestandaardiseerd met behulp van een schapehartspierextract, dat een hoog gehalte aan plasmalogenen bevat. De gevormde lysofosfolipiden liepen op de plaat achter de overeenkomstige diacylverbindingen.

## 2.7 KLEURREAGENTIA OP LIPIDEN

Na chromatografie werden de volgende reagentia toegepast: Fosfaat (op silicagel), met de molybdaat-zwavelzuurspray volgens Dittmer en Lester<sup>8</sup>. Fosfaat (op papier), met een ammoniummolybdaat-perchloorzuurspray<sup>9</sup>. Primaire aminogroep, met de ninhydrine-spray volgens Skidmore en Entenman<sup>10</sup>. Choline met Dragendorff's reagens<sup>10</sup>. Vicinale OH-groepen met het perjodaat-Schiff-reagens<sup>11</sup>. Lipiden met jodiumdamp<sup>12</sup>.

## 2.8 BEPALING VAN LIPIDENFOSFOR NA SILICAGEL-CHROMATOGRAPHIE

Chromatografisch verkregen, met jodium gekleurde lipidevlekken, waarin niet meer dan 500  $\mu\text{g}$  organische stof aanwezig was, en blanco's werden afgekrabd en overgebracht in pyrex reageerbuizen (160 x 16 mm). In iedere buis werd 0,4 ml gec.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -70%  $\text{HClO}_4$  (9:1) gepipetteerd met een geheel glazen, repeterende spuit. De buizen werden afgesloten met een glazen knikker en de destructie werd uitgevoerd bij 180° (30 min.) in een electrisch verwarmd metalen blok. Na afkoelen werd 9,6 ml van een mengsel van 22 ml ANSA-reagens en 500 ml 0,26% ammoniumheptamolybdaat (4 aq.) toegevoegd. Het ANSA-reagens bevatte 3,43 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 0,063 g 1-amino-2-naftol-4-sulfonzuur en 0,125 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  per 25,0 ml water<sup>13</sup>. Na mengen op een Vortex mixer werden de buizen afgedekt met parafilm, 20 min. op 90° verwarmd en direct daarna gekoeld met kraanwater. Het silicagel kon door 5 min. centrifugeren (2500xg) en decanteren worden verwijderd. De extinctie werd gemeten bij 820 nm in cuvetten met een lichtweg van 1 cm. Bij iedere bepaling werden reagens-blanco's en standaard fosfaatoplossingen (met 10  $\mu\text{g}$  P) meegevoerd bij de kleurprocedure. De extinctie van het gezuiverde silicagel van de plaat (blanco) bedroeg 0,002 - 0,005 per 4  $\text{cm}^2$ , van het reagens (blanco) 0,000 - 0,003 en van 10  $\mu\text{g}$  P ca. 0,880. Een mengsel van gec.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 70%  $\text{HClO}_4$  werd

gekozen, omdat zuiver  $\text{HClO}_4$  gedeeltelijk verdampste<sup>14</sup>, hetgeen de kleurintensiteit beïnvloedde. De destructie vond bovendien sneller plaats dan bij gebruik van  $\text{H}_2\text{SO}_4$  alleen zoals in de methode van Bartlett<sup>15</sup>, waarbij men soms  $\text{H}_2\text{O}_2$  moet toevoegen en opnieuw moet destrueren. Het door deze auteur bepaalde pH-gebied voor kleurstabiliteit werd echter wel in acht genomen.

## 2.9 BEPALING VAN RADIOACTIVITEIT

$^{32}\text{P}$  en  $^3\text{H}$  in papierstrips van chromatogrammen, in lipidenoplossingen en in microliter hoeveelheden waterige oplossingen werden bepaald met behulp van een scintillatieteller in 10 ml toluen, waarin opgelost 3 g 2,5-difenyloxazol (PPO), 0,2 g 1,4-bis-2-(4-methyl-5-fenyl-oxazolyl)benzeen (dimethyl-POPOP) per liter toluen. Chromatogrammen werden bij voldoende activiteit ook bestudeerd met een automatische scanner of door het maken van een autoradiogram met Kodirex no-screen röntgenfilms (Kodak). Lipiden- $^{32}\text{P}$  en  $^3\text{H}$  in silicagelvlekken werden geteld in dezelfde vloeistof, echter met 3,5% Cab-O-Sil om het silicagel gedispergeerd te houden. De aanvankelijk gebruikte 3% gaf een enigszins instabiel gel bij 0°, terwijl de vaak gebruikte 4% (na homogeniseren in een Waring blender) niet met een repeterende spuit kon worden toegediend wegens de te hoge viscositeit.

Waterige oplossingen van  $^{32}\text{P}$ - of  $^3\text{H}$ -bevattende stoffen werden geteld in de vloeistof van Bray<sup>16</sup> (60 g naftaleen, 4 g 2,5-difenyloxazol (PPO), 0,2 g 1,4-di-2-(5-fenyloxazolyl)benzeen (POPOP), 100 ml methanol, 20 ml ethyleenglycol en p-dioxaan tot 1 l). Quench-correcties werden bij  $^{32}\text{P}$  toegepast met behulp van de techniek van de interne standaard en bij  $^3\text{H}$  met behulp van gequenchte standaarden.

## 2.10 DIVERSE BEPALINGEN

De volgende bepalingen werden zonder modificatie uitgevoerd: cholesterol<sup>17</sup>, glycerol<sup>18</sup>, proteolipiden-eiwit<sup>19</sup>, totaal lenseiwit<sup>20</sup>, osmolariteit<sup>21</sup>; bloed-glucose met glucoseoxidase op dextrostix teststrips en met hexokinase/glucose-6-fosfaatdehydrogenase (testcombinatie, zie Materialen).

## 2.11 NORMALE MEDIA VOOR LENSINCUBATIE

- a. Krebs-Ringer bicarbonaat<sup>22</sup>,
- b. TC 199<sup>23, 24</sup>,
- c. Kinoshita-medium (zo genoemd in deze dissertatie).

Bereiding<sup>25</sup>: 100 ml TC 199 plus 40 ml bicarbonaatbuffer. De samenstelling

van de bicarbonaatbuffer: 91 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 3,68 mM  $\text{KHCO}_3$ , 27,6 mM  $\text{NaCl}$  en 1,15 mM  $\text{KCl}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  werd toegevoegd tot een concentratie van 9,2 mg per 100 ml medium.

In deze drie media was glucose steeds aanwezig in een concentratie van 5,0 mM.

## 2.12 CATARACTOGENE MEDIA

a. 90 ml Krebs-Ringer bicarbonaat<sup>22</sup> plus 10 ml 300 mM glucose, galactose of fructose (controle).

b. 100 ml TC 199 plus 40 ml bicarbonaatbuffer (zie 2.11 c) plus 16 ml oplossing van 55 mg glucose, 33,6 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 848 mg glucose, galactose of fructose (controle)<sup>26</sup>.

In deze media was naast de 30 mM glucose, galactose of fructose steeds 5,5 mM glucose aanwezig, terwijl de eindconcentratie aan fenolrood 2 mg/100 ml bedroeg ter beoordeling van de pH tijdens de incubatie.

## 2.13 INCUBATIEOMSTANDIGHEDEN

Alle incubaties vonden plaats bij 37° in een stationair medium, dat met  $\text{CO}_2$  op pH 7.4 werd gebracht en met het gasmengsel  $\text{N}_2\text{-O}_2\text{-CO}_2$  (90:5:5) werd geëquilibreerd. Er werd gebruik gemaakt van gesloten vaatjes om nauwkeurig een bepaalde osmotische waarde te kunnen handhaven. Voor incubaties langer dan 5 uur werden de media gesteriliseerd door millipore-filtratie en werden penicilline en streptomycine toegevoegd. Glaswerk werd met 30%  $\text{HNO}_3$  gereinigd en vervolgens geautoclaveerd.

## 2.14 CHEMIKALIËN

Alle gebruikte chemikaliën waren van de hoogste kwaliteit, die in de handel verkrijgbaar was, tenzij anders vermeld. Oplosmiddelen voor microanalytisch werk werden gezuiverd door destillatie. Aan chloroform werd vervolgens 1% methanol toegevoegd.

De volgende materialen komen in aanmerking voor bronvermelding:

D-galactose (für Leberfunktionsprüfung) (1); silicagel H (1); ouabaïne (strofantine-g) (1); fosfatidylserine (2); eilecithine (2); fosfatidezuur (3); polyfosfoinositiden (3); cerebrosiden (3); cardioline (4); scintillatie-chemikaliën (5); TC 199 medium (6); adenosinetri-fosfaat-dinatriumzout (7); cytidinetri-fosfaat-dinatriumzout (7); cytidinemonofosfaat-dinatriumzout (7); galactose-1-fosfaat-bariumzout (2); Sil-prep (8); alkalische magnesiumsilicaat, 'for TLC', zonder indicator (9); dinatriumhydro-[<sup>32</sup>P]-fosfaat, carrier-vrij, 5-20 mC/mg P (10);

[2-<sup>3</sup>H]-myo-inositol, 0,25 mC/0,035 mg (11); slangegif van *Crotalus Adamanteus* (fosfolipase-A) (2); fosfolipase-D uit kool (2); Dextrostix (met glucose oxidase) (12); hexokinase/glucose-6-fosfaat dehydrogenase (7); silicagel, 100 mesh (13); 72 % perchloorzuur, ultrazuiver (1).

Bovengenoemde chemikaliën werden betrokken van de volgende firma's:

1. E. Merck A. G., Darmstadt, Duitsland.
2. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.
3. Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Buckinghamshire, Engeland.
4. Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, U.S.A.
5. Packard Instrument Company, Inc., Downers Grove, Illinois, U.S.A.
6. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.
7. C. F. Boehringer und Soehne GmbH., Mannheim, Duitsland.
8. Applied Science Laboratories, Inc., State College, Philadelphia, U.S.A.
9. M. Woelm, Eschwege, Duitsland.
10. Philips Duphar, Amsterdam, Nederland.
11. New England Nuclear Corp., Boston, Massachusetts, U.S.A.
12. Laboratoires Ames, Epernon, Frankrijk.
13. Mallinckrodt Chemical Works, New York, New York, U.S.A.

#### LITERATUURREFERENTIES

1. A. PIRIE en R. VAN HEYNINGEN, *Biochemistry of the Eye*, Thomas, Springfield, 1956.
2. A. GELLHORN en W. BENJAMIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 84 (1964) 167.
3. J. FOLCH, M. LEES en G. H. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497.
4. J. J. WREN en A. D. SZCZEPANOWSKA, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 405.
5. M. L. VORBECK en G. V. MARINETTI, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 3.
6. R. M. C. DAWSON en J. EICHBERG, *Biochem. J.*, 96 (1965) 634.
7. K. OWENS, *Biochem. J.*, 100 (1966) 354.
8. J. D. DITTMER en R. L. LESTER, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 126.
9. S. BURROWS, F. S. M. GRYLLS en J. S. HARRISON, *Nature*, 170 (1952) 800.
10. W. D. SKIDMORE en C. ENTENMAN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 471.
11. J. BADDILEY, J. G. BUCHANAN, R. E. HANDSCHUMACHER en J. F. PRESCOTT, *J. Chem. Soc.*, 1956, 2818.
12. G. BRANTÉ, *Nature*, 163 (1949) 651.
13. F. PARKER en N. F. PETERSON, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 455.
14. R. M. C. DAWSON, in: G. V. Marinetti, *Lipid Chromatographic Analysis*, Vol. 1, M. Dekker, New York, 1967, p. 163.
15. G. R. BARTLETT, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 466.
16. G. A. BRAY, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 279.
17. M. J. LYNCH, S. S. RAPHAEL, S. D. MELLOR, P. D. SPARE, P. HILLS en M. J. H. INWOOD, *Medical Laboratory Technology*, Saunders, Londen, 1964, p. 147.
18. O. RENKONEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 367.

19. H. H. HESS en E. LEWIN, J. Neurochem., 12 (1965) 205.
20. J. H. KINOSHITA, L. O. MEROLA en S. HAYMAN, J. Biol. Chem., 240 (1965) 310.
21. R. L. BOUWMAN, H. V. TRANHAM en P. A. CAULFIELD, J. Lab. Clin. Med., 43 (1954) 310.
22. H. A. KREBS en K. HENSELEIT, Z. Physiol. Chem., 210 (1932) 33.
23. L. Z. BITO en C. V. HARDING, Exp. Eye Res., 4 (1965) 146.
24. TH. O. SIPPEL, Invest. Ophthalmol., 1 (1962) 377.
25. L. O. MEROLA, H. L. KERN en J. H. KINOSHITA, Arch. Ophthalmol., 63 (1960) 830.
26. J. H. KINOSHITA, L. O. MEROLA en B. TUNG, Exp. Eye Res., 4 (1965) 146.

# IDENTIFICATIE EN KWANTITATIEVE ANALYSE VAN DIACYL EN VINYLETHER FOSFOLIPIDEN IN OOGWEEFSELS

## 3.1 INLEIDING

Een gedetailleerde analyse van de fosfolipidensamenstelling van oogweefsels ontbrak tot nu toe. Het werk van Krause<sup>1, 2, 3</sup> (1934–1938) verschaftte weliswaar gegevens betreffende de lecithine-, sfigomyeline- en cefalinefracties in een aantal oogweefsels, maar volgens de huidige maatstaven waren deze fracties zeer onzuiver. De resultaten zullen daarom niet worden besproken.

In dit hoofdstuk worden de isolatie, identificatie en kwantitatieve analyse door middel van twee-dimensionale dunnelaag-chromatografie beschreven van de fosfolipiden in zeven oogweefsels. De resultaten werden reeds eerder gepubliceerd<sup>4</sup>. Voor de extractie werd gebruik gemaakt van neutrale chloroform-methanol-mengsels, zodat polyfosfoinositiden en andere sterk polaire lipiden niet of in geringe hoeveelheden werden geëxtraheerd.

Deze studie werd ondernomen als uitgangspunt voor een voortgezet onderzoek naar de lipidensamenstelling van dierlijke en menselijke oogweefsels in normale en cataractogene omstandigheden. Het gedeelte van dit onderzoek betreffende de lens is in de hoofdstukken 4–8 beschreven.

## 3.2 MATERIALEN EN METHODEN

### 3.2.1 *Hersenlipiden*

Sfigomyeline werd bereid uit een extract van runderhersen, dat als volgt werd verkregen. Runderhersen (200 g) werden drie maal geëxtraheerd met 1 liter aceton door homogeniseren in een Waring blender, gevolgd door filtratie van het tot ca. -20° gekoelde extract. Op deze wijze werd een grote hoeveelheid cholesterol verwijderd, terwijl de fosfolipiden nagenoeg onoplosbaar bleven. Het residu werd vervolgens in 2 liter chloroform-methanol (2:1) bij kamertemperatuur verder geëxtraheerd. Het extract werd na een nacht roeren gefiltreerd en gezuiverd met 0,2 volume 0,1 M KCl (2.4). Zoals bekend bevat de verkregen chloroformfase een grote hoeveelheid proteolipiden<sup>5</sup>. Het eiwit hiervan werd gedenatureerd door herhaald droogdampen met ethanol. Na filtreren werden de lipiden opgeslagen in benzeen-ethanol (4:1) bij -25°.

### 3.2.2 *Erwtenlipiden*

Fosfatidylinositol werd bereid uit erwten volgens een modificatie van een reeds eerder beschreven methode<sup>6</sup>. Diepvrieserwten (2 kg) werden met aceton en chloroform-methanol geëxtraheerd, zoals in 3.2.1 voor runderhersen is beschreven. Aceton extraheerde veel pigment. Het chloroform-methanol-extract werd in vacuüm geconcentreerd tot 400 ml, gemengd met 2 liter aceton, een nacht bij 4° weggezet en tenslotte gecentrifugeerd (4°). Het sediment werd opgelost in 50 ml chloroform. Deze oplossing werd gedroogd met anhydrysch natriumsulfaat, gefiltreerd, gemengd met 500 ml aceton en 5 ml azijnzuur. Na centrifugeren werd het sediment opgelost in chloroform-methanol (2:1), waarna een zuivering werd toegepast, zoals hierboven is beschreven voor de chloroform-methanol-oplossing van sfingomyeline.

### 3.2.3 *Kolomchromatografische bereiding van sfingomyeline en fosfatidylinositol*

Het sfingomyeline en het fosfatidylinositol werden door kolomchromatografie geïsoleerd. Teneinde een goed lopende kolom met grote capaciteit te verkrijgen werd de deeltjesgrootte scherper begrensd en de gemiddelde deeltjesgrootte verlaagd. Hiertoe werden de volgende bewerkingen toegepast. Silicagel ('100 mesh') werd gezeefd door 200 mesh gaas. Het opgevangen materiaal werd een nacht op 130° verhit, gekoeld in een exsiccator en gesuspenderd in 5 vol. methanol met een watergehalte van minder dan 0,05%. De suspensie werd 's nachts in een afgesloten maatcilinder magnetisch geroerd en vervolgens, na 5 min. sedimenteren, gedecanteerd. Het sediment werd bewaard voor kolomchromatografie van neutrale lipiden. Van de verkregen suspensie werd, na 15 min. sedimenteren, het supernatant gedecanteerd. Het sediment werd gebruikt voor de kolomchromatografie van fosfolipiden.

Een kolom van 22 x 1,5 cm werd gevuld met ca. 10 g silicagel in methanol tot een bedhoogte van 15 cm. Na equilibreren met chloroform werd het fosfolipidenextract opgebracht in chloroform (100–500 µg P). De kolom werd geëluëerd met chloroform (neutrale lipiden)<sup>8</sup>, waarna 's nachts een gradient van toenemende hoeveelheid methanol in chloroform werd toegepast. De kolom stond hiertoe in verbinding met een cilindrisch vat (10 cm hoog x 7,5 cm diam.) gevuld met 160 ml chloroform, dat aangesloten was op een conisch vat (bodemdiam. 7,5 cm, hoek tussen bodem en wand 60°) geheel gevuld met methanol. Bij een aanvankelijk ingestelde loopsnelheid van 0,4 ml/min. werden met het hersenextract zeven afzonderlijke fosfolipidenfracties geëluëerd:

1. fosfatidezuur + cardiolipine
2. fosfatidylethanolamine

3. fosfatidylinositol + fosfatidylserine
4. fosfatidylcholine
5. sfingomyeline
6. sfingomyeline
7. lysolecithine

Elk van de zeven fracties bevatte geringe hoeveelheden ( $< 10\%$ ) van de voorgaande en van de volgende fractie. Het erwtenextract leverde in hoofdzaak de eerste drie kolomfracties. Fractie 3 werd gebruikt om fosfatidylinositol te isoleren door middel van preparatieve dunnelaag-chromatografie. Fractie 5 en 6 van het hersenextract werden gebruikt als sfingomyelinestandaard.

#### 3.2.4 Fosfatidezuur

Fosfatidezuur werd als volgt bereid: 20 mg eilecithine, opgelost in 5 ml ether werd toegevoegd aan een mengsel van 2 ml 0,1 M acetaatbuffer pH 5,6, 2 ml  $\text{CaCl}_2$  0,02 M en 8 mg fosfolipase-D (ref. 9). De ether werd grotendeels in vacuüm afgedampt en de verkregen emulsie 5 uur bij  $28^\circ$  geïncubeerd. Hierbij werd 90% van het fosfatidylcholine omgezet.

#### 3.2.5 Lysofosfolipiden

Lysofosfatidylethanolamine en lysofosfatidylcholine werden verkregen door de overeenkomstige diacylverbindingen als volgt te hydrolyseren met fosfolipase A (ref. 9). 1 g eilecithine opgelost in 50 ml ether werd toegevoegd aan 50 ml 0,1 M Tris/HCl-buffer pH 7,4, waarin opgelost 300 mg natriumdesoxycholaat, 20 mg slangegif van *Crotalus adamanteus* en  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mM). De ether werd grotendeels in vacuüm afgedampt en de verkregen emulsie werd een nacht bij  $41^\circ$  geïncubeerd, terwijl krachtig werd geroerd. Na extractie en zuivering werd ca. 500 mg lysofosfatidylcholine verkregen. Lysofosfatidylethanolamine werd op overeenkomstige wijze bereid, uitgaande van 10 mg fosfatidylethanolamine.

#### 3.2.6 Synthetische fosfolipiden

Wij ontvingen synthetisch fosfatidylethanolamine van Dr. F. J. M. Daemen (Nijmegen) en difosfatidylglycerol, fosfatidylglycerol en acyl-difosfatidylglycerol van Dr. P. P. M. Bonsen en Dr. G. H. de Haas (Utrecht).

#### 3.2.7 Zuivering en karakterisering

Alle niet-synthetische lipiden werden door preparatieve dunnelaagchromatografie in twee loopvloeistoffen (2.5) gezuiverd tot minder dan 5% verontreiniging.



nigende lipiden aanwezig waren. Zij werden gekarakteriseerd, zoals hieronder is beschreven voor de fosfolipiden van oogweefsels.

### 3.2.8 *Isolering van oogweefsselfosfolipiden*

Oogweefsels (2.3) werden tenminste 3 uur bij 37° geïncubeerd in 8 vol. (vol./gew.) Krebs-Ringer-bicarbonaatbuffer pH 7,4, waaraan 1 mC  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  per 40 ml was toegevoegd om de fosfolipiden te merken. Na de incubatie werden de weefsels gewassen met dezelfde buffer zonder isotoop.

Gemerkte en ongemerkte weefselmonsters werden 15–30 sec. in koude methanol gehomogeniseerd in een semi-micro Waring blender. Wegens hun taaiheid was voor cornea en sclera een Ultra Turrax nodig. Vervolgens werden drie extracties uitgevoerd met 10 vol. (vol./gew.) chloroform-methanol (1:1). Na iedere extractie werd het homogenaat gefiltreerd of gecentrifugeerd. Verdere extractie leverde slechts sporen fosfolipiden (< 0,1%). De gecombineerde extracten werden in vacuüm bij 30° geconcentreerd tot ongeveer 0,5 ml. Dit residu werd opgenomen in 20 vol. (per g geëxtraheerd weefsel) chloroform-methanol (2:1). De oplossing werd gewassen met 0,2 vol. 0,1 M KCl en synthetische bovenfase (2.4) en de bovenfasen werden geëxtraheerd met 0,5 vol. chloroform (Fig. 3.1). De gecombineerde chloroformfasen werden in vacuüm enkele malen drooggedampt, waarbij telkens abs. ethanol werd toegevoegd. Het residu werd opgelost in benzeen-abs. ethanol (4:1) en bij -25° bewaard.

De afzonderlijke fosfolipiden werden verkregen door dunnelaagchromatografie zoals in 2.5 werd beschreven. Het extract werd als een 15 cm brede band op de plaat gebracht. De dikte van de laag bedroeg 0,3 - 0,8 mm afhankelijk van de hoeveelheid benodigde lipiden. Voor scherpe scheidingen werden de dunnere lagen gebruikt. Het chromatogram werd ontwikkeld met loopvloeistof I. Op dezelfde plaat, in een afzonderlijke strook, liep een mengsel standaardlipiden mee om de  $R_F$  waarden van de te onderzoeken fosfolipiden te markeren. Na ontwikkeling werd een autoradiogram gemaakt (2.9) en werden de standaardlipiden gekleurd door bespuiten met een 0,5%  $\text{I}_2$ -oplossing in methanol. De corresponderende banden van het weefselextract werden afgekrabd en geëluëerd met chloroform-methanol (2:3) in een kleine chromatografiekolom. Verdere zuivering van de geïsoleerde lipiden werd verkregen door de gehele procedure te herhalen met loopvloeistof II.

### 3.2.9 *Karakterisering van oogweefsselfosfolipiden*

De chromatografische eigenschappen van de geïsoleerde verbindingen en van de corresponderende standaardlipiden werden vergeleken in een tweedimensionaal systeem (2.5). Zij werden ook gedeacyleerd door alkalische hy-

drolyse (Fig. 3.1). Hierbij werd de methode van Dawson<sup>10</sup> gebruikt, welke werd gemodificeerd voor toepassing op microschaal. Het extract werd drooggedampt in een 10 ml rondbodem en het residu (maximaal 2,5 mg lipiden of 100 microgram lipiden-fosfor) opgelost in 0,15 ml tetrachloorkoolstof. Achtereenvolgens werden toegevoegd: 1,5 ml abs. ethanol, 0,13 ml water en 0,05 ml 1 N NaOH. Na 20 min. verwarmen op 37° werd 0,1 ml ethylformiaat toege-

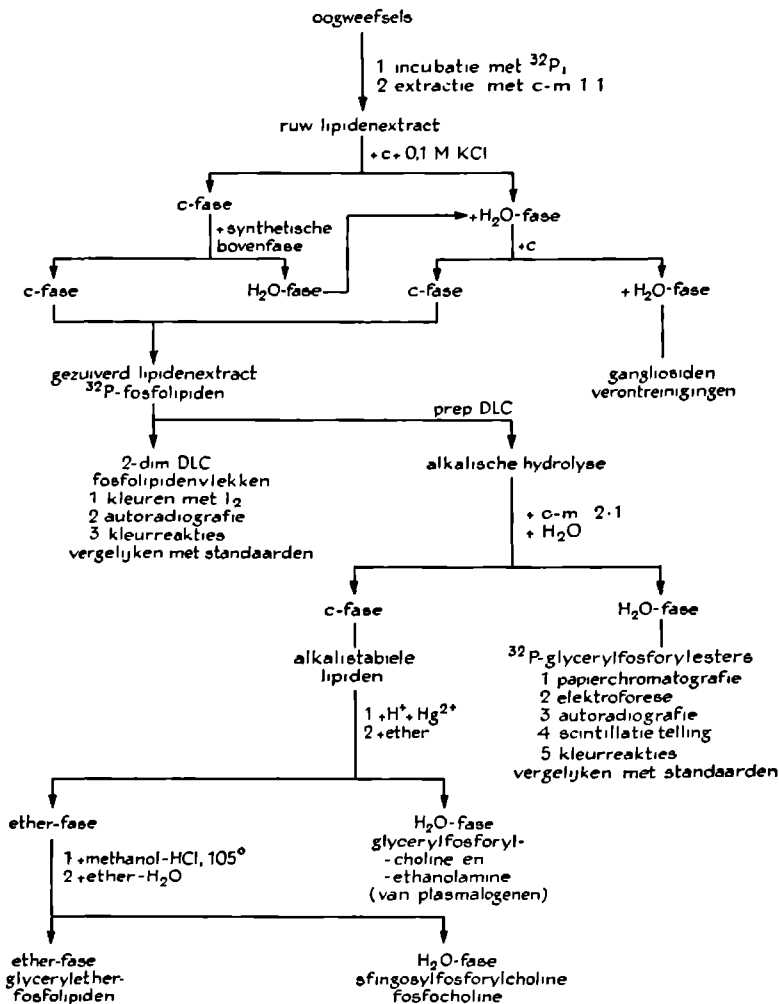


FIG. 3.1 De isolering en identificatie van fosfolipiden uit oogweefsels.

Afskortingen: c, chloroform; m, methanol; 2-dim. DLC, 2-dimensionale dunnelaagchromatografie; prep., preparatieve.

voegd en nog 5 min. verwarmd. De gevormde glycerylfosforyl-esters werden geïsoleerd door het hydrolysaat droog te dampen in aanwezigheid van een overmaat ethanol (anti-schuim). Het residu werd m.b.v. 1,7 ml methanol, 1,0 ml water en 3,4 ml chloroform overgebracht in een centrifugebuis en de fasen werden gescheiden door 2 min. (2000xg) te centrifugeren. De waterige bovenfase bevatte de esters en de onderfase de alkalistabiele lipiden, waaronder sfingomyeline, plasmalogenen en eventueel aanwezige alkyl-etherfosfolipiden. De bovenfase werd geïsoleerd en de chloroformfase werd nagewassen met 0,5 ml chloroform-methanol-water (3:48:47). De gecombineerde bovenfasen werden in aanwezigheid van 0,5 ml isopropanol (anti-schuim) drooggedampt en opgelost in 100 µl ethanol-water (6:4). De lipiden in de chloroformfase werden onderworpen aan zure hydrolyse<sup>10</sup>. De verkregen glycerylfosforylesteroplossingen waren geschikt voor papierchromatografisch onderzoek gecombineerd met hoogspanningselectroforese volgens Dawson et al<sup>10</sup>. Voor de verdere controle van de resultaten werd ook twee-dimensionale papierchromatografie gebruikt op Whatman no. 4 papier, in de eerste dimensie met fenol-water (100:38, g/v) en in de tweede dimensie met butanol-propionzuur-water (142:71:100) volgens Benson en Maruo<sup>11</sup>. De toegepaste kleurreagentia (2.7) maakten slechts één vlek zichtbaar voor ieder deacyleringsprodukt. Met autoradiografie van relatief lange duur echter gaf het fosfatidylinositol-hydrolysaat vier vlekken: glycerylfosforylinositol, anorganisch fosfaat, glycerofosfaat en fosfo-inositol. Soortgelijke hydrolyse-bijprodukten werden ook waargenomen bij het onderzoek van de polyglycerolfosfolipiden. Papierchromatogrammen die extreem lage gehalten aan <sup>32</sup>P bevatten werden in 1–2 cm brede strookjes geknipt en door middel van vloeistof-scintillatietelling (2.9) op activiteit onderzocht, zodat de R<sub>F</sub> waarde van de onbekende verbinding kon worden vastgesteld. Het onderzoek van de alkalistabiele fractie verliep volgens Fig. 3.1 (ref. 10).

### 3.2.10 *De bepaling van de fosfolipidensamenstelling*

Na isolering en karakterisering van de fosfolipiden, verkregen uit de verschillende oogweefsels, werd de fosfolipidensamenstelling bepaald met behulp van kwantitatieve twee-dimensionale dunnelaagchromatografie op silicagel-lagen van hoge zuiverheid (2.5 en 2.8). Lokalisering van de componenten op de plaat vond plaats door middel van jodiumdamp en autoradiografie (2.7 en 2.9).

3.3.1 *Dunnelaagchromatografie*

Om de vele fosfolipiden, welke in oogweefsels bleken voor te komen, te kunnen isoleren, was een twee-dimensionaal dunnelaagsysteem nodig van hoog scheidend vermogen. De systemen van Abramson en Blecher<sup>12</sup> en van Skidmore en Entenman<sup>13</sup> bleken dit vermogen in onze proefopstellingen niet te bezitten. De eerstgenoemde methode had bovendien het nadeel, dat kleine hoeveelheden vet-aldehyde van de plasmalogenen werden afgesplitst bij het drogen na ontwikkeling in de eerste dimensie. Dit was blijkbaar te wijten aan azijnzuur uit de loopvloeistof, dat op de plaat achterbleef. Hierdoor liep wat lysofosfatidylethanolamine op de plaat achter het fosfatidylethanolamine aan bij ontwikkeling in de tweede dimensie. Om dit te vermijden werd een ammoniakaal vloeistofmengsel voor de eerste dimensie gebruikt. Voor een optimaal scheidend vermogen werd een zuur vloeistofmengsel in de tweede dimensie toegepast in verband met de zwitter-ion structuur van bepaalde fosfolipiden en het zure of basische karakter van andere (2.5). De toevoeging van alkalische magnesiumsilicaat aan het silica gel verhoogde het scheidend vermogen en versnelde de chromatografie. Het gebruik van neutraal magnesiumsilicaat als bijmengsel werd door Rouser en medewerkers<sup>14</sup> beschreven. Het doel hiervan was echter de calciumsulfaatbinder te vervangen door een component, die de fosfolipidscheiding niet nadelig beïnvloedde. Aanwezigheid van de door ons gezuiverde silica gel bij de bepaling van fosfaat en van suikers gaf uiterst lage blanco's. Hierdoor kon de reproduceerbaarheid van de fosfolipidenanalyse worden verbeterd.

De toegepaste behandeling van de silica gel kwam voort uit de ervaring, dat men de in de literatuur beschreven resultaten van de dunnelaagchromatografie van lipiden moeilijk kan reproduceren. De oorzaken hiervan zijn vooral de variaties in vochtgehalte en chemische samenstelling van de laag. Vocht verlaagt de 'activiteit' van de silica gel, waardoor de  $R_F$ -waarden hoger worden. Conditionering is daarom gewenst.

De chemische samenstelling van de laag wordt in het algemeen verwaarloosd. In de handel zijn vele goede silica gels te verkrijgen, welke echter meestal verschillende fosfolipidenchromatogrammen leveren onder gelijke omstandigheden. Past men een zure en/of basische voorbehandeling toe, in combinatie met een selectie van de deeltjesgrootte, dan worden verbeterde reproduceerbaarheid, loopsnelheid en zuiverheid verkregen.

Op het oppervlak van de silica geldeeltjes kunnen aanwezig zijn Si=O, Si-O-Si en Si-OH groepen, zodat de interactie lipide-silica gel zowel electrostatisch als door middel van waterstofbruggen kan plaats vinden. Het eerste type binding

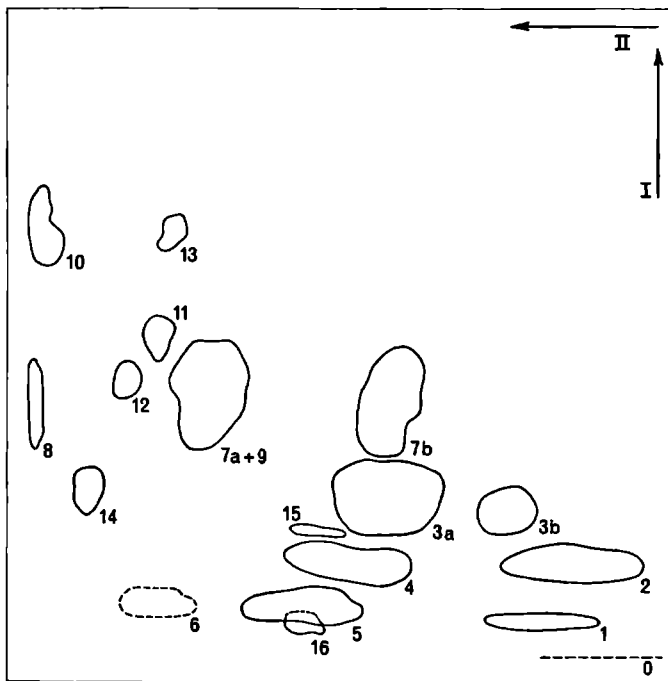


FIG. 3 2 Tekening van een twee-dimensionaal dunnelaagchromatogram van een lipidenextract van kalfsiris op silicaathoudende silicagel Na ontwikkeling in de eerste dimensie met chloroform-methanol-5 M ammonia (75:34:6), werd de lipidenstrook bespoten met een azijnzure  $\text{HgCl}_2$ -oplossing, gedroogd in vacuüm en ontwikkeld in de tweede dimensie (voor plasmalogeenbepaling) met chloroform-methanol-azijnzuur-water (75:25:8:3) De lipiden werden gekleurd met jodiumdamp. Componenten D, E, F, G en K werden door autoradiografie gevonden

De vlekken hebben de volgende identiteit: 0, oorsprong; 1, lysofosfatidylcholine; 2, sfingomyeline; 3a, diacylfosfatidylcholine; 3b, lysofosfatidylcholine van cholineplasmalogeen; 4, fosfatidylinositol; 5, fosfatidylserine; 6, fosfatidezuur, 7a, diacylfosfatidylethanolamine; 7b, lysofosfatidylethanolamine van ethanolamineplasmalogeen; 8, difosfatidylglycerol; 9, fosfatidylglycerol; 10, niet-geïdentificeerd fosfolipide F en neutrale lipiden; 11, cerebrosiden; 12, 13, 14, 15 en 16, niet-geïdentificeerde fosfolipiden G, K, E, D en H

komt tot stand door ionenuitwisseling, waarbij het proton van  $\text{Si-OH}$  overgedragen wordt aan een fosfaat- of aminogroep in een fosfolipidemolekuul. Men veronderstelt, dat water het tot stand komen van waterstofbruggen bevordert. Aan het ene proton van het  $\text{H-O-H}$  is dan b.v. de carbonylgroep van fosfatidylserine gebonden, terwijl aan het andere het zuurstofatoom van  $\text{Si=O}$  of  $\text{Si-O-}$  gebonden is<sup>15</sup>.

De silicagels, die met zuur behandeld zijn, verkeren vrijwel geheel in de kiezelzuurvorm. Door sporen vrijkomend zuur kunnen vinyletherbindingen ver-

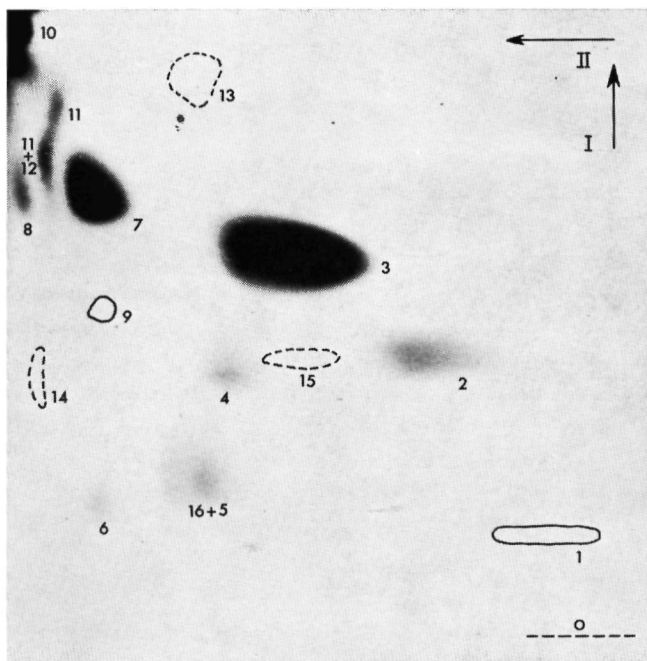


FIG. 3.3 Foto van een twee-dimensionaal dunnelaagchromatogram van een lipidenextract van kalfscornea op silicaathoudende silicagel.

De platen werden als volgt ontwikkeld: in de eerste dimensie met chloroform-methanol-5 M ammonia (90:45:11) en in de tweede dimensie met chloroform-methanol-azijnzuur-water (90:40:12:2). De lipiden werden gekleurd met jodiumdamp. De vlekken hebben de volgende identiteit: 3, fosfatidylcholine en cholineplasmalogenen; 7, fosfatidylethanolamine en ethanolamineplasmalogenen. De andere nummers verwijzen naar Fig. 3.2.

broken worden, zodat bij chromatografie van plasmalogenen staartvorming optreedt. Om dit te vermijden en om meer variatie in bindingstype mogelijk te maken is het invoeren van silicaatgroepen nodig. Silicaten verschillen van kiezelzuur, doordat zij meer als protonen-acceptors fungeren dan als protonendonors. Bij aanwezigheid van silicaat zijn de fosfolipiden sterker geïoniseerd, waardoor sterkere bindingen kunnen optreden. Wij behandelden daarom de met zuur gereinigde silicagel met ammonia. Bij het wassen van de kolom met ammoniakale vloeistof werden op deze wijze niet alleen silicaatgroepen ingevoerd, maar werd ook een bruine band met verontreinigingen geëluëerd.

Om het silicaatgehalte van de laag goed in de hand te hebben, werd het 'ammoniakale' silicagel verhit tot het in water nagenoeg neutraal reageerde. Vervolgens werd een basisch reagerende 'magnesiumsilicaat' ( $2 \text{ MgO} \cdot 3 \text{ SiO}_2$ )

toegevoegd. De polariteit van de hieruit bereide dunnelaag kon nu naar behoefte verhoogd worden, door een hoger gehalte aan alkalische 'magnesium-silicaat' te kiezen. Een gehalte van 2% bleek voldoende voor optimale scheiding van de oogweefselfosfolipiden. Bij de bepaling van plasmalogenen was 1% voldoende.

Bij de kwantitatieve dunnelaagchromatografie van de plasmalogenen bleek de vorming van lysofosfolipiden op de plaat snel en volledig te verlopen, wanneer  $\text{Hg}^{2+}$  ionen en azijnzuur samen werden gebruikt. Behandeling van de lipiden met  $\text{Hg}^{2+}$  ionen alleen<sup>16</sup>, gaf te lage uitkomsten, hetgeen veroorzaakt werd door de aanwezigheid van het alkalische magnesiumsilicaat (zie 2.6). Fig. 3.2 toont het lipidenpatroon, dat met deze methode werd verkregen na kleuren met jodiumdamp. De niet-geïdentificeerde fosfolipiden D, E, F, G en K konden uitsluitend op de plaat worden gevonden door middel van autoradiografie. Fosfatidylglycerol werd in het gebruikte systeem niet van fosfatidylethanolamine gescheiden.

### 3.3.2 Karakterisering van de fosfolipiden

De concentraties van vele oogweefsellipiden bleken zeer laag te zijn, vooral in de cornea en het glasachtig lichaam. Daarom werden de weefsels met  $^{32}\text{P}$  geïncubeerd, teneinde de fosfolipiden door middel van hun geïncorporeerde activiteit op het chromatogram te kunnen lokaliseren. Fig. 3.3 toont een dunnelaagchromatogram van cornealipiden na kleuring met jodiumdamp. De niet geïdentificeerde componenten D, E, F, G en K waren waarschijnlijk fosfolipiden, omdat zij  $^{32}\text{P}$  incorporeerden, oplosbaar waren in chloroform en bij chromatografie een polariteit vertoonden, die met de fosfolipiden overeenkwam. De identificatie van F uit menselijke lens wordt in hoofdstuk 5 beschreven. Het chromatogram en/of het autoradiogram van de lensfosfolipiden leverde twee vlekken van fosfatidezuur, van fosfatidylinositol en van fosfatidylserine. In de Dawson-procedure (3.2.9) gaven deze lipiden slechts één glycerylfosforylester-vlek. Een mogelijke verklaring voor het optreden van dubbelvlekken werd door Shimojo en Ohno<sup>17</sup> voor cardiolipine en door Carter en Weber<sup>18</sup> voor fosfatidylinositol gegeven. Zij suggereerden, dat zouten van deze lipiden met verschillende kationen verantwoordelijk zouden zijn voor de dubbelvlekken.

Verdere karakterisering van de geïsoleerde fosfolipiden volgens Fig. 3.1 leverde  $R_F$  waarden, welke overeenkwamen met die voor de glycerylfosforylesters van choline, ethanolamine, serine, inositol, glycerol en met de deacyleeringsprodukten van difosfatidylglycerol (cardiolipine) en fosfatidezuur.

Zure hydrolyse van de alkalistabiele fractie in aanwezigheid van  $\text{Hg}^{2+}$  leverde

glycerylfosforylethanolamine en zeer geringe hoeveelheden glycerylfosforylcholine uit elk oogweefsel extract (Fig. 3.1). Op deze wijze en door de beschreven dunnelaagtechniek werd aangetoond, dat plasmalogenen aanwezig waren in de ethanolamine- en cholinefosfolipidenfracties. Hydrolyse van de sfigomyelinevlek van de dunnelaagplaat en van het nu nog resterende etherextract van de zure hydrolyse met methanol-HCl, gevolgd door papierchromatografie van de produkten, bevestigden de identiteit. Een geringe hoeveelheid chloroformoplosbaar materiaal, dat ook bestand was tegen deze hydrolyse, bestond waarschijnlijk uit glycerylether-fosfolipiden. Dit werd echter niet bewezen.

### 3.3.3 *Kwantitatieve analyse*

De totale fosfolipidenconcentratie was relatief hoog in de oogweefsels, welke sterk gevasculariseerd (retina, iris, choroidea) en geïnerveerd (retina) waren (Tabel I). De waarde voor de retina (627  $\mu\text{g}$  lipide-fosfor per g natgewicht) is van dezelfde grootte-orde als die voor longen<sup>19</sup>, nier<sup>19, 20, 21</sup>, hart<sup>19</sup> en lever<sup>19</sup>. Hij is tweemaal lager dan voor hersenen<sup>19</sup>, waarmee hij vaak wordt vergeleken. Dat lens, cornea, choroidea en glasachtig-lichaam een relatief gering aantal cellen bezitten, heeft tot gevolg, dat de fosfolipidenconcentraties in deze weefsels laag zijn. Geringe hoeveelheden lysofosfatidylcholine werden in alle oogweefsels aangetroffen. De sfigomyelinepercentages vertoonden in het algemeen slechts geringe verschillen (14,3–18,2%). De retina en het glasachtig-lichaam vormden hierop uitzonderingen met resp. 5,8% en 30,5%. Met de thans beschikbare kennis van de moleculaire bouw van diverse weefsels, is het echter nog niet mogelijk een verklaring voor deze uitzonderingen te geven.

In tegenstelling tot de hier gegeven waarden voor kalfslens vonden Feldman, Feldman en Rouser<sup>22</sup> een zeer hoog sfigomyeline percentage in menselijke lenzen van onbekende leeftijd, terwijl ook de andere waarden sterk van de onze afweken. Dat hier sprake is van leeftijds- en soortverschillen zal in de volgende twee hoofdstukken aangetoond worden.

De fosfolipiden van het glasachtig-lichaam bleken geconcentreerd te zijn in de perifere cellagen (de hyalocyten). Deze zeer dunne vliesachtige structuren bleven achter bij voorzichtige filtratie van dit oogweefsel door Whatman nr. 1 filtreerpapier. Met behulp van dunnelaagchromatografie konden geen fosfolipiden in een extract van het filtraat worden aangetoond.

De choline- en ethanolamine-fosfolipiden waren de belangrijkste fosforhoudende lipiden in alle oogweefsels. De ethanolamine-fosfolipiden bleken aanzienlijke hoeveelheden plasmalogenen te bevatten (Tabel II). De hoeveelheid choline-plasmalogenen was zeer gering. Andere plasmalogenklassen konden niet worden aangetoond. Het is echter niet uitgesloten, dat fosfatidylserine



TABEL I DE FOSFOLIPIDEN VAN HET KALF SOOG

De resultaten werden verkregen door kwantitatieve dunnelaagchromatografie in duplo en zijn uitgedrukt in procenten van het totaal lipidenfosfor na chromatografie.

De vinyl etherfosfolipiden zijn bij de corresponderende diacylverbindingen ingesloten. De percentages zijn de gemiddelden ( $\pm$  standaardfout) van bepalingen in 3 extracten (lens: 4) Ieder extract werd bereid uit de gelijksoortige weefsels van 7-10 ogen (leeftijd 0-3 maanden)

Fosfolipiden	Retina	Iris	Choroidea	Lens	Cornea	Sclera	Glasachtig lichaam
Lysofosfatidylcholine	0,1 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,5 = 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2
Sfingomyeline	5,8 $\pm$ 0,3	14,3 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,5	18,2 $\pm$ 0,4	16,3 $\pm$ 0,5	18,2 $\pm$ 0,6	30,5 $\pm$ 1,3
Fosfatidylcholine	40,1 $\pm$ 1,0	31,6 $\pm$ 0,8	35,6 = 0,6	31,8 $\pm$ 2,4	35,2 $\pm$ 1,2	39,4 = 1,0	36,0 $\pm$ 0,9
Fosfatidylinositol	6,4 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,8
Fosfatidylserine*	10,0 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,5	9,9 $\pm$ 0,3	12,3 $\pm$ 0,2	12,2 $\pm$ 0,4	10,3 $\pm$ 0,5	3,7 = 0,7
Fosfatidylethanolamine	33,8 $\pm$ 0,8	31,8 $\pm$ 0,9	27,6 $\pm$ 0,6	33,2 $\pm$ 0,8	25,0 $\pm$ 0,7	24,8 $\pm$ 0,6	15,3 $\pm$ 1,0
Difosfatidylglycerol	3,0 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,5
Fosfatidezuur	0,3 = 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,5	0,4 = 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2
Fosfatidylglycerol	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,2 = 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,03	—
Fosfolipide F**	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,6
Opbrengst	100,0 $\pm$ 0,7	98,5 $\pm$ 1,2	99,9 $\pm$ 0,1	99,9 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 0,8	99,5 $\pm$ 0,4	94,2 = 1,6
$\mu\text{g}$ lipidenfosfor per g natgew.	627 $\pm$ 1	310 $\pm$ 6	209 = 5	72,0 $\pm$ 1,3	70,0 $\pm$ 1,3	47,5 $\pm$ 1,0	0,13 $\pm$ 0,01

\* Fosfatidylserine en H (zie tekst).

\*\* Niet geïdentificeerd De hoeveelheden van de andere niet-geïdentificeerde componenten waren  $< 0,1\%$ .

TABEL II DE PLASMALOGENEN VAN HET KALF SOOG

De resultaten werden verkregen door kwantitatieve dunnelaagchromatografie van de intacte fosfolipiden in de eerste dimensie, gevolgd door hydrolyse van de plasmalogenen en chromatografie in de tweede dimensie. De waarden zijn de percentages van het totaal ethanolamine- en cholineplasmalogenen (gemiddelden van 2 bepalingen van 1 extract).

Fosfolipiden	Retina	Iris	Choroidea	Lens	Cornea	Sclera	Glasachtig lichaam
Ethanolamineplasmalogenen	32,6	52,4	49,9	50,2	43,4	67,1	31,4
Cholineplasmalogenen	1,2	2,5	2,1	1,1	2,3	3,0	1,5

en fosfatidylinositol zeer geringe hoeveelheden plasmalogenen bevatten, zoals in sommige andere weefsels is aangetoond.

Het percentage fosfatidylinositol in de verschillende weefsels varieerde tussen 1,9 en 6,8%. De hoogste waarden werden in retina (6,4%) en in iris (6,8%) gevonden. Het is opvallend, dat dergelijke relatief hoge percentages voor dit fosfolipide vooral in weefsels met een intensieve stofwisseling gevonden zijn. Behalve de iris en de retina, behoren hiertoe ook de lever en de hartspier<sup>20</sup>. Uit het autoradiogram bleek, dat fosfatidylinositol steeds een snelle inbouw van <sup>32</sup>P<sub>i</sub> vertoonde, hetgeen op een snelle turnover van de fosfoinositolgroep duidde. Hoewel het metabolische aspect, in dit analytisch gerichte deel van het onderzoek, niet bestudeerd werd, was dit gegeven toch de eerste aanwijzing, dat oogweefsels een actief fosfolipidenmetabolisme zouden bezitten. Bij kortere incubatietijden werd eveneens een sterk radioactieve fosfatidezuurvlek waargenomen. Samen met de labeling van de andere fosfolipiden, welke met de tijd toenam, en de in hoofdstuk 8 besproken resultaten, vormde dit het eerste bewijs voor de biosynthese van fosfolipiden in oogweefsels.

Het percentage fosfatidylserine voor de verschillende oogweefsels vertoonde weinig variatie (9,8–12,3%), met uitzondering van de lage waarde in het glasachtig-lichaam (3,7%). De cardiolineconcentratie was het hoogste in de retina, de iris en de choroidea. Dit is waarschijnlijk te danken aan het feit, dat cardioline een belangrijke component is van mitochondriën<sup>14, 23, 24</sup>, welke in deze weefsels veel voorkomen. In lens is alleen het epitheel rijk aan deze subcellulaire structuren. De lens als geheel heeft dan ook een lage cardiolineconcentratie. Fosfatidylglycerol komt slechts in zeer geringe hoeveelheden in de oogweefsels voor. Men heeft het aangetoond in mitochondriën<sup>22</sup> en enkele andere structuren<sup>24</sup>. De fosfatidezuurconcentratie was evenals in andere zoogdierweefsels zeer laag, hetgeen in overeenstemming is met de precursorfunctie, zoals die in verschillende weefsels is aangetoond<sup>6</sup>. De hoeveelheden van de niet geïdentificeerde fosfolipiden D, E, G en K waren te gering voor een bepaling. De H-vlek viel op de plaat gedeeltelijk samen met die van fosfatidylserine. Voor zover H kon worden geïsoleerd, werd een percentage tussen 1 en 4 vastgesteld. Lysofosfatidylethanolamine werd niet gevonden. De corresponderende standaard was op de plaat tussen sfingomyeline en fosfatidylinositol gesitueerd.

### 3.4 SAMENVATTING

1. Voor de identificatie en de kwantitatieve analyse van fosfolipiden werd een verbeterd systeem voor twee-dimensionale dunnelaagchromatografie ontwikkeld.
2. De met <sup>32</sup>P gemerkte diacyl- en vinyl ether-fosfolipiden uit oogweefsels van

het kalf werden met behulp van preparatieve dunnelaagchromatografie geïsoleerd. Zij werden geïdentificeerd door chromatografische vergelijking van hun hydrolyseprodukten met standaardstoffen.

3. De fosfolipidensamenstelling van retina, iris, choroidea, lens cornea, sclera en glasachtig-lichaam werd bepaald. In alle oogweefsels waren de volgende fosfolipiden kwantitatief de belangrijkste:

fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine, ethanolamineplasmalageen, fosfatidylserine, sfingomyeline en fosfatidylinositol. De volgende componenten kwamen in geringe hoeveelheden voor:

fosfatidylglycerol, cardiolipine, fosfatidezuur, cholineplasmalageen, lyso-fosfatidylcholine, enkele niet-geïdentificeerde fosfolipiden en vermoedelijk glyceryletherlipiden.

#### LITERATUURREFERENTIES

1. *Tabulae Biologicae*, Vol. XXII (Oculus), Pars 2, Junk, Den Haag, 1951, p. 7, 40, 85, 96, 104 en 109.
2. A. C. KRAUSE, *Am. J. Physiol.*, 110 (1934) 182.
3. A. C. KRAUSE, *The Biochemistry of the Eye*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1934.
4. R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 307.
5. J. FOLCH-PI, in *Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies*, J. Folch-Pi en H. J. Bauer, Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 18.
6. G. B. ANSELL en J. N. HAWTHORNE, *Phospholipids*, BBA Library, Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1964.
7. P. DECKER en H. HÖLLER, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 392.
8. P. WAYS en D. J. HANAHAN, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 318.
9. F. HAVERKATE, Dissertatie, Utrecht, 1965, p. 14.
10. R. M. C. DAWSON, in G. V. Marinetti, *Lipid Chromatographic Analysis*, Vol. I, M. Dekker, New York, 1967, p. 163.
11. A. A. BENSON en B. MARUO, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 189.
12. D. ABRAMSON en M. BLECHER, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 628.
13. W. D. SKIDMORE en C. ENTENMAN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 471.
14. G. ROUSER, C. GALLI, E. LIEBER, M. L. BLANK en O. S. PRIVETT, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41 (1964) 836.
15. G. ROUSER, G. KRITSCHESKY, D. HELLER en E. LIEBER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 40 (1963) 425.
16. K. OWENS, *Biochem. J.*, 100 (1966) 354.
17. T. SHIMOJO en K. OHNO, *J. Biochem.*, 60 (1966) 462.
18. H. F. CARTER en E. J. WEBER, *Lipids*, 1 (1966) 16.
19. R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 75 (1960) 45.
20. R. M. C. DAWSON, N. HEMINGTON en J. B. DAVENPORT, *Biochem. J.*, 84 (1962), 497
21. D. O. TINKER en J. HANAHAN, *Biochemistry*, 5 (1966) 423.
22. G. L. FELDMAN, L. S. FELDMAN en G. ROUSER, *Lipids*, 1 (1966) 161.
23. M. G. McFARLANE, *Advances in Lipid Research*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1964, p. 103.
24. R. J. ROSSITER, overzicht in G. Schettler, *Lipids and Lipidoses*, Springer, New York, 1967, p. 107, 108.

SAMENSTELLING EN METABOLISME VAN DE  
FOSFOLIPIDEN IN NORMALE DIERLIJKE LENZEN

## 4.1 INLEIDING

Bij de aanvang van dit onderzoek waren slechts weinig gedetailleerde gegevens beschikbaar omtrent de samenstelling van de fosfolipiden van de lens, terwijl niets bekend was over hun metabolisme (zie 1.1.1 en 1.1.2). Uit hoofdstuk 3 blijkt, dat de fosfolipidenfractie in de kalfslenz, vergeleken met die van lever en de retina, een lage concentratie heeft en dat deze fractie een ingewikkelde samenstelling vertoont. Aangezien de fosfolipiden bouwstenen zijn van membranen, kan de kennis van hun verdeling en van hun metabolisme in de lens van belang zijn voor een beter begrip van de verschijnselen, die optreden bij de vorming van de cataract. Deze informatie kan ook meer inzicht geven omtrent de veranderingen, die optreden bij het verouderen van de lenscellen. In dit hoofdstuk worden samenstelling en  $^{32}\text{P}$ -incorporatie van de fosfolipiden van dierlijke lenzen en van lensdelen besproken. De resultaten werden reeds eerder gepubliceerd<sup>1</sup>.

## 4.2 MATERIALEN

Voor alle rattelenz-experimenten in vivo en in vitro werden jong-volwassen albino ratten gebruikt (Wistar,  $240 \pm 5$  g). Het gemiddelde gewicht van de rattelenzen bedroeg 36,3 mg. Ogen van andere dieren werden onmiddellijk na de dood verwijderd en binnen 3 uur op ijs naar het laboratorium gebracht. Kalfslenzen (gem. gewicht 1,17 g) werden verkregen zoals in 2.3 is beschreven. Om hiervan de lensdelen te isoleren, werden kaspel en epitheel, na voorzichtig openknippen langs de voorzijde, met een pincet verwijderd. Vervolgens werd de lens in koude fysiologische zoutoplossing 5 minuten snel geroerd om de buitenste cortexlaag in de vloeistof te dispergeren. Dit werd herhaald met de rest van de lens om de binnenste cortexlaag te isoleren. Het overblijvende deel van de lens (diameter ca. 5 mm) werd 'kern' genoemd.

## 4.3 METHODEN

4.3.1 *Experimenten in vitro*

Kalfs- of rattelenzen tot een totaal gewicht tussen 1 en 2 gram werden in 5 vol. (v/g) Krebs-Ringer-bicarbonaatmedium geïncubeerd gedurende

1-5 uur (2.13). TC 199 werd gebruikt voor incubaties gedurende 3-46 uur. De samenstelling van dit medium vertoont veel overeenkomst met het kamerwater. Het werd in vroegere lensstudies met succes toegepast<sup>2,3</sup>.

#### 4.3.2 *Experimenten in vivo*

De totale hoeveelheid  $^{32}\text{P}$  in de lensfosfolipiden, in plasma en in het kamerwater werd gemeten op verschillende tijdstippen na intraperitoneale injectie (in ratten) van  $0,9 \mu\text{C } ^{32}\text{P}_1/\text{g}$  lichaamsgewicht. De ogen werden onder chloroformnarcose snel geenucleëerd en onmiddellijk hierna werd een monster van 1 ml bloed uit het hart genomen. Vóór de lensextractie uit het oog werd  $0,5 \mu\text{l}$  kamerwater uit de voorste oogkamer genomen met behulp van een microinjectiespuit. Voor iedere bepaling van de activiteit van de individuele fosfolipiden werden 20 ratten intraperitoneaal met  $2,6 \mu\text{C } ^{32}\text{P}_1/\text{g}$  lichaamsgewicht ( $4,1 \mu\text{C/g}$  voor de 3-uurs periode) ingespoten. De dieren werden na 3, 8 en 24 uur gedood.

#### 4.3.3 *De extractie van de lipiden*

De lenzen werden in 4 vol. methanol (v/g) gedurende 2 uur bij  $-25^\circ$  gekoeld. Na verwarming tot kamertemperatuur werden zij in deze vloeistof in een klein mortier gehomogeniseerd. Na toevoegen van eenzelfde vol. chloroform werd 3 min. bij  $2500 \times \text{g}$  gecentrifugeerd. Het residu werd nog twee maal met hetzelfde volume chloroform-methanol 1:1 geëxtraheerd gedurende 10 min. Na zuivering van dit ruwe extract werden de lipiden bij  $-25^\circ$  opgeslagen (2.4). Het residu van de kalfslenzen werd geëxtraheerd met chloroform-methanol-HCl om de met  $^{32}\text{P}$  gemerkte polyfosfoinositiden te isoleren. Hiervoor werd de procedure van Dawson en Eichberg gevolgd<sup>4</sup>.

#### 4.3.4 *Analytische en chromatografische technieken*

De dunnelaag- en identificatietechnieken werden beschreven in hoofdstuk 3. De hydrolyse-produkten van de polyfosfoinositiden (inositol-di- en trifosfaat) werden gescheiden door papierchromatografie in de eerste dimensie en hoogspanningselectroforese in de tweede dimensie<sup>4</sup>. De inositolfosfaten werden gelokaliseerd met behulp van autoradiografie. Hun  $R_F$  waarden lagen dicht bij de opgegeven waarden van Dawson en Eichberg<sup>4</sup>. De radioactiviteit van  $0,3 \text{ ml}$  plasma werd gemeten in  $10 \text{ ml}$  vloeistof volgens Bray (2.9). De bepaling van fosfor (2.8), van plasmalogenen (2.6) en van radioactiviteit (2.9) werden reeds beschreven. Monsters lipidenextract, kamerwater en stukjes papierchromatogram werden in toluëenscintillatievloeistof gemeten door middel van vloeistofscintillatietelling.

#### 4.4.1 *De fosfolipidensamenstelling van de dierlijke lens*

In Tabel I is de fosfolipidensamenstelling weergegeven van lenzen van acht verschillende diersoorten. Hieruit blijkt, dat deze samenstelling enige variatie vertoont van soort tot soort. Let men op de lenzen van zoogdieren beneden de leeftijd van tien jaar, dan valt het op, dat de meeste percentages geen grote schommelingen vertonen, terwijl de concentraties sterk uiteenlopen. De sfingomyeline- en fosfatidylcholinepercentages variëren sterker dan de andere percentages en er is een zekere relatie met de leeftijd bij de zoogdieren. Met uitzondering van de runderlens stijgt het sfingomyelinepercentage met toenemende leeftijd, terwijl het fosfatidylcholinepercentage daalt, hoewel het verschillende diersoorten betreft. Wij zullen dit verband de S-PC-relatie noemen\*). Het is interessant om na te gaan of deze relatie met de leeftijd ook voor de lens van een bepaalde diersoort geldt. Dit onderzoek wordt in het volgende hoofdstuk beschreven. Opmerkelijk is, dat een dergelijke S-PC-relatie ook voor de erythrocyten van verschillende diersoorten bestaat. De sfingomyeline- en fosfatidylcholinepercentages, zoals ze door Nelson werden gevonden<sup>6</sup>, variëren respectievelijk van 11 tot 51 en van 48 tot 0, terwijl dit voor de lens respectievelijk is: van 5 tot 46 en van 48 tot 7. Waarschijnlijk is hier sprake van een wederzijdse vervangbaarheid van deze molekuulsoorten in membraanstructuren. De veranderingen in de fosfolipidensamenstelling, die optreden in de erythrocyten bij de ziekte van Tay-Sachs (zie ref. 7) en bij bepaalde soorten geelzucht<sup>8,9</sup>, steunen deze veronderstelling. In beide gevallen stijgt het percentage fosfatidylcholine, terwijl dat van sfingomyeline daalt. Een ander voorbeeld zal hieronder worden gegeven bij de bespreking van de fosfolipidensamenstelling van lensfracties. De S-PC-relatie blijkt in bovengenoemde gevallen onafhankelijk van de totale fosfolipidenconcentratie te zijn.

#### 4.4.2 *De fosfolipidensamenstelling van lensfracties*

Voor de analyse van lensdelen werd de kalvslens gekozen. De leeftijd hiervan is goed bekend en wegens zijn grootte is een verdeling in lagen mogelijk. De fosfolipidensamenstelling van lenzen van kalveren van 2-3 maanden oud lijkt veel op die van de ongeveer even oude ratten, die in deze studie werden gebruikt (resp. Tabel II en I). Oudere lenzen hadden een lager fosfolipidengehalte en een hoger sfingomyelinepercentage (vergelijk de runderlens in Tabel I met de kalvslens in Tabel II). Tronche en Mandel<sup>10</sup> bepaalden het fosfolipidengehalte van 3 lagen van kalfs- en runderlenzen na acetonprecipitatie. In tegenstelling tot onze resultaten vonden zij het laagste fosfolipidenge-

\*) Afkortingen, zie Tabel 1

TABEL I

## DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN LENZEN VAN VERSCHILLENDE DIERSOORTEN

De waarden zijn de gemiddelden van analyses van twee extracten van 6–12 lenzen van elke diersoort. De fosfolipidensamenstelling is uitgedrukt in procenten van het totaal lipidenfosfor, bepaald na dunnelaagchromatografie. Opbrengst ( $\pm$  S.D.) van de chromatogrammen:  $96,5 \pm 3,4\%$ .

Diersoort (leeftijd in jaren)	Totaal lipidenfosfor in $\mu\text{g/g}$	Fosfolipidensamenstelling*									
		S	PC	PI	PS	PE	'LPE'	U	LPC	DPG	Andere**
Aap (10–15)	185	46,0	7,2	0,5	8,7	19,6	11,3	4,9	1,3	0,1	0,6
Schaap (7)	86	30,5	20,0	3,5	10,5	32,9	0,5	–	–	0,6	0,8
Rund (3)	46	23,8	24,6	2,6	13,0	34,1	0,3	–	0,9	0,4	0,6
Konijn (1)	77	27,8	26,7	1,4	10,7	30,9	0,3	–	0,5	0,6	1,2
Varken (0,5)	67	21,1	29,1	2,8	10,3	33,9	–	–	–	0,7	2,2
Rat (0,4)	95	15,5	31,5	2,8	14,3	30,5	–	–	1,1	1,5	1,4
Kabeljauw (1)	115	5,2	48,2	2,8	8,4	32,4	–	–	–	0,6	2,0
Kip (0,5–0,7)	93	29,7	22,6	2,4	7,1	24,8	3,3	2,3	0,5	2,0	4,1

\* Afkortingen: S, sfingomyeline; PC, fosfatidylcholine; PI, fosfatidylinositol; PS, fosfatidylserine; PE, fosfatidylethanolamine; 'LPE', fosfolipide, dat zich chromatografisch gedraagt als lysoPE (zie tekst); U, niet-geïdentificeerd fosfolipide, dat zich chromatografisch gedraagt als H uit kalfslens (3,3); LPC, lysofosfatidylcholine; DPG, difosfatidylglycerol.

\*\* Fosfatidezuur (PA), front van het chromatogram (F), fosfatidylglycerol (PG).

TABEL II DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN FRACTIES VAN DE KALFSLENS

De waarden zijn het gemiddelde van tenminste drie experimenten. Afkortingen: zie Tabel I.

Lens of lensfractie	Totaal lipidenfosfor in µg/g	Fosfolipidensamenstelling (% van totaal lipidenfosfor)										
		LPC	S	PC	PI	PS	PE	PA	DPG	F	PG	Andere*
Totale lens	72,0	0,5	18,2	31,8	1,9	12,3	33,2	1,0	0,3	0,5	0,2	0
Epitheel**	131,5	0	9,0	47,3	7,3	3,7	35,7	1,0	2,3	2,9	0,3	0,7
Buitenste cortexlaag	91,7	0,5	16,9	35,6	2,8	4,0	39,0	0,7	0,6	0,3	0	0
Binnenste cortexlaag	62,4	0,5	20,0	29,0	1,7	12,6	34,1	1,3	0,9	0,3	0,2	0,4
Kern	41,8	0,7	23,9	30,0	1,9	12,2	28,9	1,0	0,2	0,9	0,2	0,1

\* Andere: niet geïdentificeerde componenten.

\*\* Inclusief het voorste lenskapsel. Het achterste kapsel bevatte slechts  $2,4 \mu\text{g}$  lipidenfosfor per g weefsel.

halte in de kalfslens, terwijl de diepere cortexlagen het hoogste totale fosfolipidengehalte hadden van de geanalyseerde lenslagen. Deze waarden kunnen beïnvloed zijn door de precipitatiemethode, die door deze auteurs werd gebruikt. Onze resultaten (Tabel II) vertonen een sterke daling van het fosfolipidengehalte in de richting van epitheel naar kern. Deze daling en de door Pirie en Van Heyningen<sup>11</sup> waargenomen vrij hoge concentraties van glycerylfosforylesters en fosforylverbindingen van choline en ethanolamine suggereren een sterker fosfolipidencatabolisme in de kern dan in de perifere lagen van de lens.

Kleine hoeveelheden glycerylfosforyl-choline en -ethanolamine zijn in een aantal weefsels aangetoond. Studies met <sup>32</sup>P in vivo brachten voor de lever een precursorprodukt-relatie aan het licht die bewees, dat deze stoffen producten zijn van het fosfatidylcholine- en fosfatidylethanolamine-catabolisme<sup>12</sup>. Een specifieke fosfodiësterase, welke in vele weefsels aanwezig is, splitst de base af van glycerylfosforyl-choline en -ethanolamine, waardoor ook glycerofosfaat vrijkomt<sup>13, 14</sup>. Dit kan eventueel opnieuw voor de synthese van fosfoglyceriden of voor de glycolyse gebruikt worden. De afbraak van de cholinefosfolipiden is in Fig. 4.1 samengevat<sup>15</sup>. Het catabolisme van de ethanolaminefosfolipiden verloopt langs soortgelijke wegen.

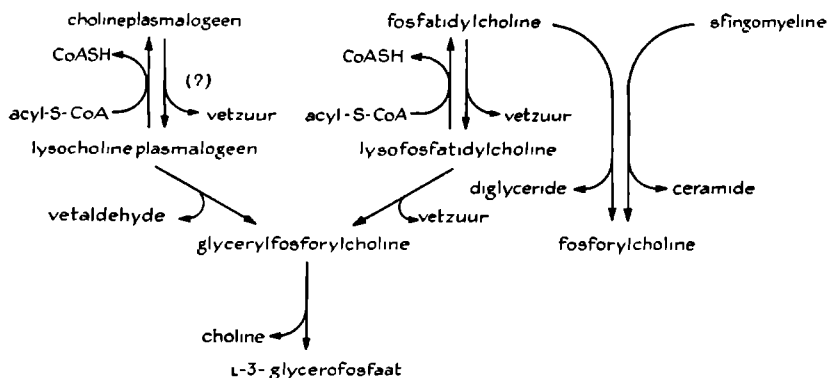


FIG. 4.1 Het catabolisme van de cholinefosfolipiden (volgens Dawson<sup>15</sup>, gewijzigd).

Polyfosfoinositiden konden alleen in de lens worden aangetoond door autoradiografie. De lenzen werden hiertoe gedurende 5 uur geïncubeerd met <sup>32</sup>P<sub>i</sub>, waarna de inositiden werden geëxtraheerd en gescheiden in twee richtingen volgens Dawson en Eichberg<sup>4</sup>. De hoeveelheden waren te gering voor bepaling.

Een studie van de fosfolipidensamenstelling van lensdelen werd nog niet eerder verricht. Uit onze resultaten blijkt, dat de percentages van sfingomyeline



en fosfatidylserine stijgen, terwijl die van fosfatidylcholine en fosfatidylinositol dalen, wanneer men in Tabel II gaat van epitheel naar kern, dus van jonge naar oudere lensdelen. Aangezien de kern op hogere leeftijd een steeds groter deel van de lens inneemt, is het te verwachten, dat oudere lenzen een hoger sfingomyeline en een lager fosfatidylcholinepercentage zullen vertonen. Dit zou opnieuw een voorbeeld van de in 4.4.1 vastgestelde S-PC-relatie zijn (zie hoofdstuk 5).

#### 4.4.3 Veranderingen in fosfolipidsamenstelling tijdens de incubatie

Om een mogelijke invloed van de incubatie op de fosfolipidsamenstelling vast te stellen, werden analyses uitgevoerd na verschillende incubatieperioden in het TC 199-medium. De totale lensfosfolipidenconcentratie bleef gedurende tenminste 46 uur onveranderd:  $71,7 \pm 1,0 \mu\text{g P/g lens}$  ( $\pm$  S.D.). Het fosfatidylinositolpercentage echter nam toe van 1,9 tot 3,7%. Omdat de verdere incubaties altijd aanzienlijk korter duurden, werd hieraan geen verdere aandacht besteed. Na 5 uur incuberen in Krebs-Ringer-bicarbonaat werden geen significante veranderingen waargenomen.

#### 4.4.4 De $^{32}\text{P}$ -opname in de fosfolipiden van de lens en van lensfracties

De incorporatie van  $^{32}\text{P}$  was het sterkste in de fosfolipiden van het epitheel, hetgeen tot uiting kwam in een hoge specifieke activiteit (Tabel III). De kern vertoonde in het geheel geen incorporatie, tenzij hij afzonderlijk werd geïncubeerd. In dat geval echter bleef de specifieke activiteit uiterst laag. De snellere  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de epitheelfosfolipiden weerspiegelt de hoge metabolische activiteit van het epitheel ten opzichte van de diepere lagen. Kleinfeld en medewerkers<sup>16</sup> vonden een grotere opname van  $^{32}\text{P}_i$  in het epitheel dan in de andere

TABEL III

CONCENTRATIE EN  $^{32}\text{P}$ -OPNAME VAN DE FOSFOLIPIDEN VAN LENSELEN

Na incubatie van 15 kalfslenzen gedurende 3 uur in TC199-medium met  $^{32}\text{P}_i$  werden de lensdelen geanalyseerd. Afzonderlijke lenskernen werden op dezelfde wijze geïncubeerd. De waarden zijn het gemiddelde van twee experimenten met duplo-analysen van elk extract.

Lens delen	Gem. gewicht van 1 lensfractie (mg)	Lipidenfosfor ( $\mu\text{g/g}$ )	Specifieke activiteit (cpm/ $\mu\text{g}$ lipiden-P)
Epitheel*	23	131,5	163
Buitenste cortexlaag	619	91,7	23
Binnenste cortexlaag	217	62,4	15
Kern	390	41,8	0
Kern (geïncubeerd)	385	40,1	10

\* Inclusief het voorste lenskapsel. De bouw van de lens is in Fig. 4.2 weergegeven.

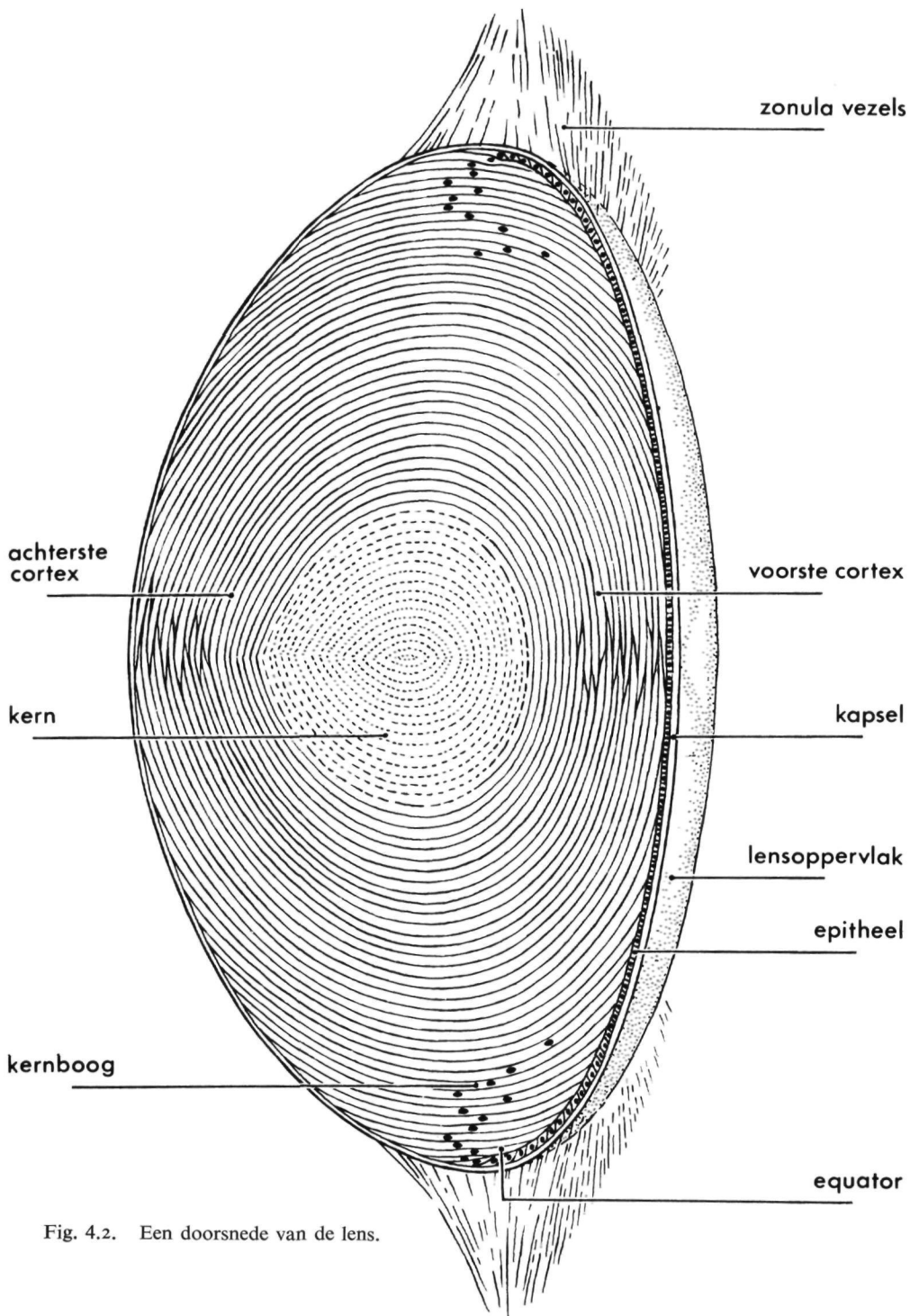


Fig. 4.2. Een doorsnede van de lens.

TABEL IV

CONCENTRATIE EN  $^{32}\text{P}$ -OPNAME VAN DE ETHANOLAMINEPLASMALOGENEN IN LENSEDELEN

De  $^{32}\text{P}$ -incorporatie werd gemeten na 3 uur incubatie in TC 199-medium en twee-dimensionale dunnelaagchromatografie van de fosfolipiden. De waarden zijn het gemiddelde van twee experimenten met duplo-analysen van elk extract. Zij zijn uitgedrukt als percentages van het totaal ethanolaminefosfolipide (EFL).

Lens (deel)	% lipiden-P van EFL	% $^{32}\text{P}$ -activiteit van EFL
Totale lens	50	10
Epitheel*	44	26
Buitenste cortexlaag	47	5
Binnenste cortexlaag	52	0
Kern	54	0

\* Inclusief voorste lenskapsel.

lensdelen. Zonder epitheel vertoonde de lens echter toch een opname van fosfaat. De sterkere labeling van de epitheelfosfolipiden was dus waarschijnlijk niet uitsluitend aan een hoge  $^{32}\text{P}$ -concentratie te danken, maar ook aan het actieve metabolisme van deze cellaag. De lage metabolische activiteit van de diepere lagen van de lens komt ook tot uiting in de lage nucleotidenconcentraties, vooral in de kern<sup>17</sup>.

#### 4.4.5 Concentratie en $^{32}\text{P}$ -opname van ethanolamineplasmalogenen in lensdelen

Wanneer de plasmalogenpercentages van de ethanolaminefosfolipiden in de verschillende lensfracties vergeleken worden (Tabel IV) valt het op, dat deze in de diepere lensdelen hoger zijn. Aangezien volgens Tabel II de totale ethanolaminefosfolipidenconcentratie van epitheel naar kern ongeveer met een factor 3 kleiner wordt, kan men zeggen, dat ook de plasmalogenconcentratie daalt, maar minder snel dan de concentratie van de overeenkomstige diacylverbinding. Het catabolisme door de fosfolipasen (Fig. 4.1) verloopt dus bij de plasmalogenen minder snel. Het percentage cholineplasmalogenen in de cholinefosfolipiden in de totale lens bedroeg 1%. Dit werd niet verder gedifferentieerd voor de verschillende lensfracties.

De ethanolamineplasmalogenen (Tabel IV) en de cholineplasmalogenen (op het autoradiogram visueel beoordeeld) vertoonden een veel lagere incorporatie van  $^{32}\text{P}$  dan de corresponderende diacylverbindingen in het epitheel. In de cortexlagen was dit verschil nog groter. Deze verschillen en het nagenoeg ontbreken van de labeling van sfigomyeline werden ook in hersenen gevonden<sup>18</sup>. Dit wijst er op, dat de plasmalogenen en sfigomyeline stabiele bestanddelen zijn van de celmembraan.

#### 4.4.6 De $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de kalbslensfosfolipiden *in vitro*

De incubatie van kalbslenzen in een  $^{32}\text{P}_i$ -bevattend Krebs-Ringermedium, leverde een lineaire toename van de specifieke activiteit van de totale fosfolipidenfractie gedurende tenminste 5 uur (Fig. 4.3). In TC 199-medium was de incorporatiesnelheid 1,4–1,5 maal langzamer, waarbij een vrijwel lineaire opname gedurende 10 uur plaatsvond.

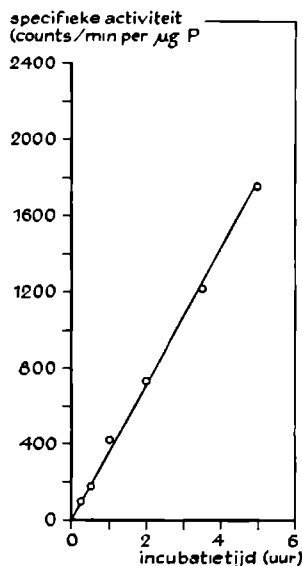


FIG. 4.3 De totale  $^{32}\text{P}$ -opname in de fosfolipiden van de kalbslens tijdens incubatie in Krebs-Ringermedium.

In Fig. 4.4a is de relatieve incorporatiesnelheid weergegeven voor enkele fosfolipiden. Hieruit blijkt de zeer snelle fosfaat-turnover van fosfatidezuur. Het tegengestelde verloop van de curven voor fosfatidezuur en fosfatidylinositol vanaf 15 min. suggereert een precursorfunctie voor fosfatidezuur in de synthese van het fosfatidylinositol. Dit stemt overeen met het door Paulus en Kennedy<sup>19</sup> gevonden synthesemechanisme voor het laatstgenoemde lipide.

In Fig. 4.4b en c zijn de specifieke activiteiten van de kalbslensfosfolipiden voor dezelfde incubatie tegen de tijd uitgezet. Deze activiteiten namen af in de volgorde  $\text{PA} > \text{PI} \gg \text{DPG} > \text{PC} > \text{PE} > \text{PS}$  (afkortingen zie Tabel I). PI, PC, PE en PS vertoonden een lineaire toename van de specifieke activiteit gedurende tenminste 5 uur. De specifieke activiteit van fosfatidezuur nam na ongeveer 1 uur iets minder snel toe, terwijl die van difosfatidylglycerol na 2 uur maximaal was. Sfingomyeline bleef inactief. In het TC 199-medium was de volgorde

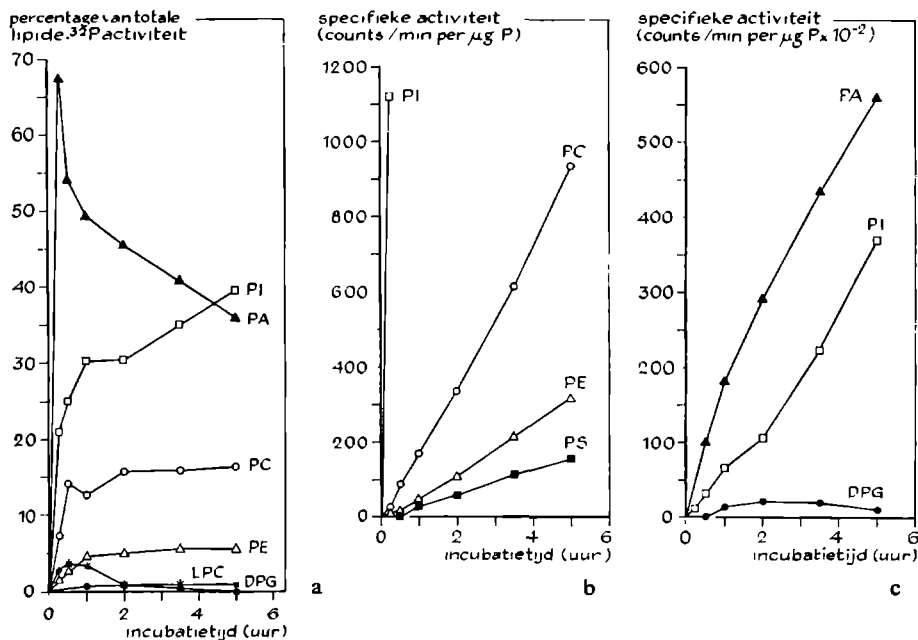


FIG. 4.4 De  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de afzonderlijke fosfolipiden van de kalflens tijdens incubatie in Krebs-Ringermedium. a, de procentuele verdeling; b en c, de specifieke activiteiten. Afkortingen als in Tabel I.

in de reeks van de bovengenoemde specifieke activiteiten dezelfde, hoewel deze activiteiten voor alle fosfolipiden lager waren. De mogelijkheid bestaat, dat de hogere  $\text{Ca}^{2+}$ -concentratie in het Krebs-Ringermedium een beter functioneren van het actieve transportmechanisme heeft bevorderd<sup>20</sup>, waardoor het glucose-transport (1.2.2) en de daarmee gekoppelde opname van  $^{32}\text{P}_i$  (ref. 21) groter waren.

#### 4.4.7 De $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de fosfolipiden van de rattelens in vivo en in vitro

Met rattellenzen werden experimenten uitgevoerd om de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in vivo en in vitro te kunnen vergelijken. Na 2 en na 5 uur was het incorporatiepatroon van de fosfolipiden van de rattelens kwalitatief gelijk aan dat van de kalflens (Tabel V). De incorporatie in vivo werd 3, 8 en 24 uur na injectie met  $^{32}\text{P}_i$  gemeten. Om na te gaan in welk tempo het isotoop in het plasma en het kamerwater verscheen en weer werd afgevoerd, werden hiervan ook monsters genomen. De activiteit in het plasma bereikte binnen 30 min. na intraperitoneale injectie zijn maximum (Fig. 4.5), waarna een snelle daling intrad. In het kamerwater werd pas na 90 min. een maximum bereikt, terwijl het ongeveer 10 uur

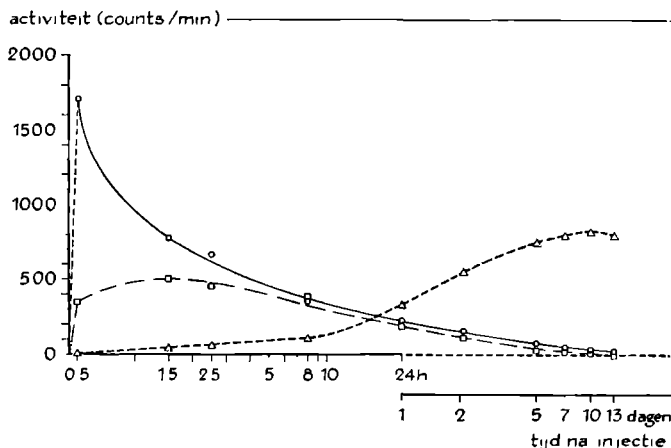


FIG. 4.5 De totale activiteit van  $^{32}\text{P}$  in de lensfosfolipiden, het bloedplasma en het kamerwater van de rat na injectie van  $0,9 \mu\text{C } ^{32}\text{P}_i/\text{g}$  lichaamsgewicht. De activiteit is weergegeven voor  $0,1 \text{ ml}$  bloedplasma (—),  $0,1 \text{ ml}$  kamerwater (-.-.-) en de fosfolipiden van 2 lenzen (---).

duurde voordat plasma en kamerwater een ongeveer gelijk gehalte aan  $^{32}\text{P}$  bereikten. Dit langzaam instellen van het evenwicht is waarschijnlijk te danken aan een toevoer van  $^{32}\text{P}$ , dat uit verschillende organen weglekte, na aanvankelijk snel te zijn opgenomen. Direct na het verschijnen van  $^{32}\text{P}$  in het kamerwater, waren zeer geringe hoeveelheden in de lensfosfolipiden te meten. Pas na 3 uur waren deze hoeveelheden juist voldoende om het incorporatiepatroon vast te stellen. Ook in vivo bleek, dat fosfatidezuur aanvankelijk een relatief hoge incorporatie vertoonde, terwijl fosfatidylcholine en fosfatidylethanolamine in

TABEL V

DE  $^{32}\text{P}$ -INCORPORATIE IN DE FOSFOLIPIDEN VAN KALFS- EN RATTELENZEN NA INCUBATIE IN KREBS-RINGER-MEDIUM

De waarden zijn de percentages van de totale  $^{32}\text{P}$ -activiteit in de lipiden na dunnelaagchromatografie. Zij zijn het gemiddelde van twee experimenten met duplo-analysen van elk extract.

Afkortingen als in Tabel I.

	Incubatie-tijd (uur)	PI	PA	PC	PE	DPG	LPC	PS	Andere *
Rattelenzen	2	22,7	61,6	8,4	2,5	4,1	0	<0,5	<0,5
	5	36,0	31,4	20,5	7,3	3,8	0	<0,5	<0,5
Kalfslens	2	30,5	45,5	15,9	5,0	1,0	0,8	<0,5	<1,3
	5	39,5	36,0	16,5	5,8	<0,5	0,9	<0,5	<1,3

\* Met behulp van autoradiografie gevonden, niet-geïdentificeerde componenten.

TABEL VI

DE  $^{32}\text{P}$ -INCORPORATIE IN DE FOSFOLIPIDEN VAN RATTETENZEN IN VIVO

De waarden zijn percentages van de totale  $^{32}\text{P}$ -activiteit van de lipiden na dunnelaagchromatografie. Zij zijn het gemiddelde van twee experimenten met duplo-analysen van elk extract. Afkortingen zie Tabel I.

Tijd na injectie (uur)	PI	PA	PC	PE	DPG	LPC	PS	Andere*
3	24	25	22	20	1	0	3	4
8	17,5	2	43,5	28	7	0	1	1
24	19	2,5	44,5	28	5	0	1	0

\* Met behulp van autoradiografie gevonden, niet-geïdentificeerde componenten.

een langzamer tempo volgden. Deze drie componenten en waarschijnlijk ook fosfatidylinositol, fosfatidylserine en difosfatidylglycerol, bevatten na 8 uur een vrijwel constant percentage van de activiteit. Opvallend is, dat fosfatidezuur na 8 uur in vivo slechts 2% van de activiteit bevatte, terwijl dit in vitro na 5 uur 31,4% was. Waarschijnlijk kan dit toegeschreven worden aan het bereiken van een hoge specifieke activiteit van fosfatidylcholine en fosfatidylethanolamine in vivo ten gevolge van de optimale groeiomstandigheden van de lens. Welke factoren hierbij van invloed waren kon in het kader van dit onderzoek niet worden uitgemaakt. De hoge specifieke activiteit, die door fosfatidylinositol in korte tijd bereikt werd, was waarschijnlijk mede te danken aan de hoge lensinositolconcentratie. In lever en lens is de vrije inositolconcentratie respectievelijk 0,14 en 2  $\mu\text{mol/g}$  natgewicht (ref. 22, 23 en hoofdstuk 7). Fosfatidylinositol wordt in lever dan ook relatief langzamer gelabeld dan in de lens<sup>24</sup>. In hersenen en nier echter is de inositolconcentratie hoog (6  $\mu\text{mol/g}$  natgewicht)<sup>22</sup> en in deze weefsels heeft men voor fosfatidylinositol een relatief sterke labeling aangetroffen na injectie in vivo en incubatie in vitro<sup>25-28</sup>. Exacte gegevens zijn echter slechts beperkt beschikbaar. Enerzijds omdat vele auteurs de fosfolipiden niet voldoende van elkaar konden scheiden, anderzijds omdat fosfatidezuur in een aantal recente onderzoeken zelfs niet werd gevonden of geanalyseerd<sup>29-32</sup>, ondanks het feit dat metabolisch actieve weefsels en korte incorporatieperioden werden gebruikt.

De incorporaties van  $^{32}\text{P}$  en van andere precursors in de fosfolipiden weerspiegelen twee processen:

1. bij de vorming van nieuw celmateriaal vindt een netto synthese van fosfolipidenmolekulen plaats;
2. in de meer stationaire toestand van de gevormde celmembranen wordt het voortdurende catabolisme door fosfolipasen in evenwicht gehouden door de synthese (Fig. 4.1 en 1.1).

Wat het nut is van dit laatste 'dynamische evenwicht' is niet duidelijk. Er zijn namelijk structuren, die deze laatste vorm van metabolisme nauwelijks vertonen, zoals myeline, *Escherichia coli*-fosfatidylethanolamine<sup>33</sup> en lenskern. Het is daarom waarschijnlijk, dat deze voortdurende opbouw en afbraak van fosfolipiden in een cel niet altijd essentieel is voor het in stand houden van de structurele integriteit van zijn membranen<sup>33</sup>. In het geval van de menselijke lenskern heeft het gebrek aan metabolische activiteit vermoedelijk wel nadelige gevolgen. Dit zal in het volgende hoofdstuk worden besproken.

De geconstateerde incorporatie van <sup>32</sup>P in kalfs- en rattelenzen moet het gevolg zijn geweest van beide typen metabolisme. De incorporatie werd namelijk vrijwel alleen gevonden in weefsels, waarin celdeling en dus ook de novo synthese van fosfolipiden plaats vond, dus in epitheel en buitenste cortexlaag. In de binnenste cortexlaag werd echter eveneens incorporatie gevonden. Gezien het feit, dat hier geen celdeling plaats vindt, terwijl de differentiatie van epitheelcel tot lensvezel voltooid is, is het zeer waarschijnlijk, dat hier het genoemde evenwicht tussen afbraak en synthese aanwezig is. De aanwezigheid van het catabolisme van fosfatidylinositol werd als volgt aangetoond. Zuiver [<sup>32</sup>P]-fosfatidylinositol uit kalfslens, dat chromatografisch werd verkregen, werd gemengd met cortexhomogenaat en gedurende 3 uur bij 37° onder stikstof geïncubeerd. Na extractie met chloroform-methanol bleek ongeveer 20% van de activiteit niet meer lipide-gebonden te zijn. Een monster cortexhomogenaat, dat eerst 10 min. op 60° werd verwarmd en als controle werd gebruikt, vertoonde deze activiteit niet. Het wateroplosbare produkt werd chromatografisch geïdentificeerd als inositolmonofosfaat. Daarom zal hier sprake geweest moeten zijn van een fosfatidylinositol inositolfosfohydrolase-activiteit, zoals die onlangs werd beschreven door Atherton, Kemp en Hawthorne<sup>33</sup> voor het darmslijmvlies. Het fosfatidylinositolmetabolisme zal in hoofdstuk 8 verder worden besproken.

#### 4.5 SAMENVATTING

1. De fosfolipidensamenstelling van 8 verschillende dierlenzen en van kalfslensfracties werd geanalyseerd. Er werden grote verschillen in de totale fosfolipidenconcentraties gevonden.
2. Het percentage svingomyeline steeg, terwijl dat van fosfatidylcholine in gelijke mate daalde bij toename van de leeftijd van de weefsels. Deze relatie bleek bijna steeds onafhankelijk te zijn van de diersoort of van de totale fosfolipidenconcentratie. Het percentage fosfatidylserine was in de kalfslenskern hoger dan in de cortex of het epitheel. Het omgekeerde gold voor fosfatidylethanolamine en fosfatidylinositol.



3. De opname van  $^{32}\text{P}$  in de fosfolipiden van kalfs- en rattellenzen werd in vitro bestudeerd en van rattellenzen in vivo. Incorporatie vond vooral in epitheel en buitenste cortexlaag plaats. De afzonderlijk geïncubeerde lenskern vertoonde een zeer geringe incorporatie.
4.  $^{32}\text{P}_i$  werd snel geïncorporeerd in fosfatidezuur en fosfatidylinositol, langzamer in fosfatidylcholine en fosfatidylethanolamine en in geringe mate in de plasmalogenen, fosfatidylserine en difosfatidylglycerol. De activiteit van het enzym fosfatidylinositol inositolfosfohydrolase werd aangetoond in een cortexhomogenaat.

#### LITERATUURREFERENTIES

1. R. M. BROEKHUYSE en J. H. VEERKAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 316.
2. L. Z. BITO en C. V. HARDING, *Exptl. Eye Res.*, 4 (1965) 146.
3. TH. O. SIPPEL, *Invest. Ophthalmol.*, 1 (1962) 377.
4. R. M. C. DAWSON en J. EICHBERG, *Biochem. J.*, 96 (1965) 634.
5. G. A. BRAY, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 279.
6. G. J. NELSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 144 (1967) 221.
7. R. M. BROEKHUYSE, *Ophthalmologica*, 152 (1966) 510.
8. J. BOON, R. M. BROEKHUYSE, P. VAN MUNSTER en E. SCHRETLEN, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 453.
9. R. M. BROEKHUYSE, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 457.
10. P. TRONCHE en P. MANDEL, *Concilium Ophthalmologicum Belgica*, Acta, Vol. I, Imprimerie Medicale et Scientifique, Brussel, 1959, p. 699.
11. A. PIRIE en R. VAN HEYNINGEN, *Biochem. J.*, 68 (1958) 18.
12. R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 59 (1955) 5.
13. R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 62 (1956) 689.
14. E. A. MARPLES en R. M. S. THOMPSON, *J. Biol. Chem.*, 74 (1960) 123.
15. R. M. C. DAWSON, in P. N. Campbell en G. D. Greville, *Essays in Biochemistry*, Vol. 2, Academic Press, 1966.
16. G. KLEINFELD, H. K. MÜLLER, U. DARDENNE, R. FUCHS, O. HOCKWIN en H. P. ARENS, *Arch. Ophthalmol.*, 156 (1955) 453.
17. P. MANDEL en J. KLETHI, *Biochim. Biophys. Acta*, 28 (1958) 199.
18. G. B. ANSELL en S. SPANNER, *Biochem. J.*, 79 (1961) 176.
19. H. PAULUS en E. P. KENNEDY, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1303.
20. L. O. MEROLA, H. KERN en J. H. KINOSHITA, *Arch. Ophthalmol.*, 63 (1960) 830.
21. H. K. MÜLLER, O. KLEINFELD, H. P. ARENS, U. DARDENNE, R. FUCHS en O. HOCKWIN, *Am. J. Ophthalmol.*, 42 (1956) 431.
22. W. W. WELLS, T. A. PITTMAN en H. J. WELLS, *Anal. Biochem.*, 10 (1965) 450.
23. R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 269.
24. M. I. GURR, C. PROTTEY en J. N. HAWTHORNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 106 (1965) 357.
25. R. M. C. DAWSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 374.
26. L. E. HOKIN en M. R. HOKIN, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 818.
27. K. HAYASHI, Y. YAGIHARA, J. NAKAMURA en S. YAMAZOE, *J. Biol. Chem.*, 60 (1966) 42.
28. A. M. PUMPHREY, *Biochem. J.*, 112 (1969) 61.
29. D. O. TINKER en D. J. HANAHAN, *Biochemistry*, 5 (1966) 423.
30. G. DE TORRONTGUEI en J. BERTHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 116 (1966) 467.
31. J. E. MILLER en W. E. CORNATZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 125 (1966) 534.
32. A. G. ULSAMER en J. L. GLENN, *Biochim. Biophys. Acta*, 125 (1966) 525.
33. R. S. ATHERTON, P. KEMP en J. N. HAWTHORNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 125 (1966) 409.

## DE INVLOED VAN DE LEEFTIJD OP DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN MENSELIJKE EN DIERLIJKE LENZEN

### 5.1 INLEIDING

Uit hoofdstuk 4 bleek, dat de fosfolipidensamenstelling van de lens weliswaar afhankelijk is van de diersoort, maar dat waarschijnlijk de leeftijd ook een factor van belang is. Hierbij kan men uitgaan van de gedachte, dat de lens gedurende het leven voortdurend groeit en hierbij in gewicht en omvang toeneemt in tegenstelling tot vele andere weefsels, waarin de celdeling slechts de afbraak van bepaalde cellen compenseert. De in de equatoriale zone gevormde cellen worden getransformeerd tot lensvezels, welke bij de lensgroei geleidelijk in diepere lagen van de cortex terecht komen en tenslotte in de kern. Op hoge leeftijd neemt men in de menselijke lens vrijwel altijd troebelingen waar<sup>1</sup>, welke het gevolg kunnen zijn van dit proces van vezelaccumulatie en de in de kern plaats vindende sclerose. In dit hoofdstuk zal worden aangetoond, dat de fosfolipiden van de lensvezels vrijwel geheel in de celmembranen zijn gelokaliseerd. Het is daarom mogelijk, dat veranderingen van deze membraanlipiden de relaties tussen de cellen zodanig veranderen, dat zij de seniele cataract direct of indirect veroorzaken.

Goldschmidt<sup>2</sup> vond in 1922 reeds een toename van de totale lipidenconcentratie in de lens bij het ouder worden. In de jaren daarna bepaalden vele onderzoekers de concentraties van totaal cholesterol, fosfolipiden en totaal lipiden. De vroege publikaties zijn door Nordmann<sup>3</sup> samengevat. In vorige hoofdstukken werden recente vorderingen besproken. In dit hoofdstuk zal de invloed van de leeftijd op de fosfolipidensamenstelling van de dierlijke en vooral op die van de menselijke lens worden besproken.

### 5.2 MATERIALEN EN METHODEN

#### 5.2.1 *Lensmateriaal*

Rattelenzen werden onmiddellijk na de dood van Wistar ratten van verschillende leeftijden gebruikt. Normale menselijke lenzen werden onmiddellijk na enucleatie van de ogen of na 12–18 uur bewaren van de ogen bij 4° verkregen.

Alleen geheel heldere lenzen van personen zonder stofwisselingsziekten werden gebruikt. Lensdelen werden als volgt geïsoleerd: na bevriezen bij  $-25^{\circ}$  werd met behulp van een kurkeboor (diameter 4 mm) een centrale cylinder uit de lens gestoken. De uiteinden hiervan (0,5 mm dik) werden met een scheermesje afgesneden en bij de corticale ring gevoegd. De gewichtsverhouding tussen corticaal en nucleair materiaal bedroeg 2:1. Cataracteuze menselijke lenzen werden direct na de operatie ingevroren.

### 5.2.2 Analytische technieken

Lipiden van afzonderlijke lenzen en van lensdelen werden twee maal met 30 vol. (v/g) chloroform-methanol (1:1) bij kamertemperatuur geëxtraheerd. Hierbij werd een geheel glazen potter-homogenisator gebruikt (inhoud 12 ml), welke tevens als centrifugebuis dienst deed. Na 20 min. staan werd gecentrifugeerd (3 min., 2500xg). Het sediment werd vervolgens met 20 vol. chloroform-methanol (2:1) gedurende 10 min. geëxtraheerd bij  $37^{\circ}$ . Na toevoegen van chloroform aan de gecombineerde extracten tot een chloroform-methanol verhouding van 2:1, werden de lipiden gezuiverd (2.4). Het lipiden-preparaat werd drie maal met chloroform-water (1:1) drooggedampt om de lipiden-eiwitbindingen te verbreken en na oplossen in chloroform-methanol (1:1) werden de eiwitten afgecentrifugeerd. De lipiden werden opgeslagen en geanalyseerd, zoals in hoofdstuk 2 werd beschreven. Polyfosfoinositiden werden aangetoond met behulp van de technieken van Dawson en Eichberg<sup>4</sup>.

## 5.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 5.3.1 De identiteit van de menselijke lensfosfolipiden

Met behulp van dunnelaagchromatografie, alkalische en zure hydrolyse, gevolgd door papierchromatografie en elektroforese van de produkten, werden de volgende componenten geïdentificeerd:

fosfatidylcholine	fosfatidyl-monomethylethanolamine
cholineplasmalogeen	fosfatidyl-dimethylethanolamine
lysofosfatidylcholine	sfingomyeline
fosfatidylethanolamine	difosfatidylglycerol (cardiolipine)
ethanolamineplasmalogeen	fosfatidylserine
lysofosfatidylethanolamine	fosfatidylinositol
fosfatidezuur	difosfoinositide
fosfatidylglycerol	trifosfoinositide

Het belangrijkste hulpmiddel hierbij was de labeling met  $^{32}\text{P}$ . De lenzen, waar-

van slechts zeer geringe aantallen beschikbaar waren, werden hiertoe met  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  geïncubeerd. Gedurende korte perioden werden fosfatidezuur en fosfatidylinositol gelabeld, terwijl bij langere incubaties (24 uur) de meeste andere componenten radioactief werden. In Fig 5.1 zijn een tekening van een met jodiumdamp gekleurd chromatogram en een bijbehorend autoradiogram afgebeeld. Lysofosfatidylethanolamine, sfingomyeline en fosfatidylserine vertoonden vrijwel geen fosfaatturnover. De hoeveelheden van deze lipiden waren echter voldoende voor detectie met reagentia. Fosfatidylmonomethyl- en -dimethyl-ethanolamine werden gekarakteriseerd zonder gebruik te kunnen maken van standaarden. De  $R_F$ -waarden van hun glycerylfosforylesters, welke na alkalische hydrolyse door papierchromatografie werden verkregen, waren vrijwel gelijk aan de waarden, welke door Dawson<sup>5</sup> werden opgegeven. Deze lipiden kunnen worden gevormd uit de cytidinedifosfaatesters van N-methylethanolamine en N,N-dimethylethanolamine volgens reacties, die analoog zijn aan de biosynthese van fosfatidylethanolamine<sup>6</sup> (zie Fig. 1.1). Hoewel methylering van fosfolipiden, die mono- en di-methylethanolamine bevatten, is aangetoond, lukte het tot nu toe niet de directe methylering van fosfatidylethanolamine enzymatisch te bewerkstelligen<sup>7,8</sup>.

Een niet-geïdentificeerde component (U), welke vooral in oudere lenzen voorkomt, werd pas na 24 uur incuberen gelabeld met  $^{32}\text{P}$ . Het chromatografisch gedrag stemde overeen met dat van component H uit de kalfslens (3.3). Het produkt van de alkalische hydrolyse van U gedroeg zich chromatografisch niet als een van de bekende glycerylfosforylesters, hoewel het chromatogram-electroferogram een vlek dicht bij glycerylfosforylcholine gaf.

De aanwezigheid van choline- en ethanolamineplasmalogenen, welke werd aangetoond met behulp van de Dawsonprocedure (zie Fig. 3.1), werd bevestigd door de twee-dimensionale dunnelaagchromatografie in combinatie met de zure  $\text{HgCl}_2$ -spray, welke werd gebruikt voor de kwantitatieve analyse (2.6).

In extracten van lenzen en lensdelen, verkregen van volwassenen en ook van 15 jaar oude apen, werd een vrij hoog percentage van een lipide gevonden, dat zich als lysofosfatidylethanolamine gedroeg in de karakteriseringsprocedures. Dit lipide kon met dezelfde technieken niet worden aangetoond in kalfs- en rattelenzen (hoofdstuk 4) of in rattelever en menselijk bloed<sup>9</sup>. In vroegere studies bleek het lysofosfatidylethanolamine vaak als artefact te zijn gevormd<sup>10</sup>. Daarom werd onderzocht of het misschien post mortem, tijdens het bewaren van de lens, of tijdens de isolatie van de lipiden ontstond. Van een 15 jaar oude aap werd direct na de dood een lens geanalyseerd, terwijl het overblijvende oog na 2 uur werd geënculeerd en gedurende 24 uur bij 4° werd bewaard. De lysofosfatidylethanolamine-concentratie in beide lenzen bleek gelijk te zijn en bedroeg 504 µg/g nat gewicht (gemiddeld lensgewicht 140 mg). In een ander

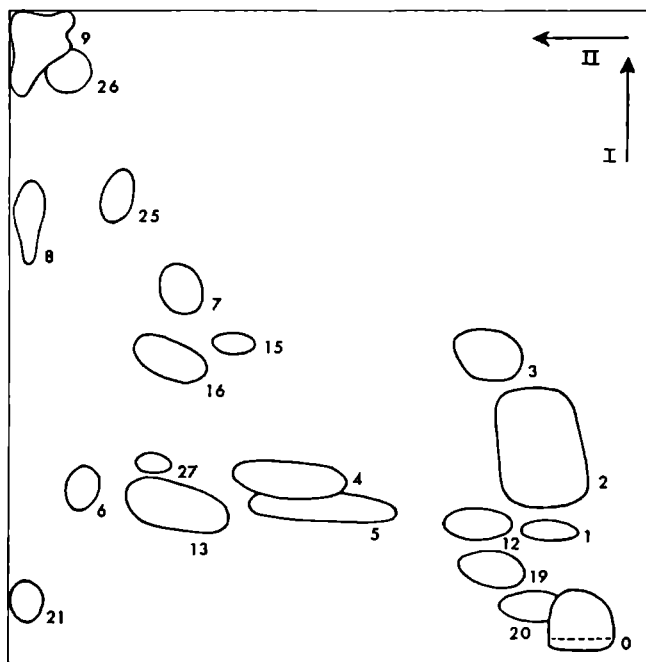


Fig. 5.1.a Dunnelaagchromatogram van een lipidenextract van de menselijke lens na 24 u incuberen met  $^{32}\text{P}$ ; tekening van het met jodiumdamp gekleurde patroon. Identiteit van de vlekken in Fig. 5.1.a en 5.1.b: O, oorsprong; 1, lysofosfatidylcholine; 2, sfingomyeline; 3, fosfatidylcholine en cholineplasmalogen; 4, fosfatidylinositol; 5, fosfatidylserine; 6, fosfadezuur; 7, fosfatidylethanolamine en ethanolamineplasmalogen; 8, difosfatidylglycerol; 9, neutrale lipiden; 10, fosfatidylmethylethanolamine; 11, fosfatidylmonomethylethanolamine; 12, lysofosfatidylethanolamine; 13, niet-geïdentificeerde component U; 14, fosfatidylglycerol; 15 en 16, glycolipiden; 17-26 niet-geïdentificeerde componenten; 25, waarschijnlijk cerebrosiden.

experiment werden menselijke lenzen gedurende 24 uur met  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  geïncubeerd, waarna de lipiden werden geëxtraheerd en gechromatografeerd. Lysofosfatidylethanolamine op de plaat bleek vrijwel geen  $^{32}\text{P}$  te bevatten, terwijl de andere ethanolaminefosfolipiden sterk radioactief waren. Hieruit kan worden geconcludeerd, dat het lysofosfatidylethanolamine een natuurlijk voorkomend lenslipide is, met nauwelijks aantoonbare fosfaatturndover en dat het tijdens de verschillende isolatieprocedures niet uit de andere ethanolaminefosfolipiden werd gevormd. Het zou het derivaat kunnen zijn van een vorm van fosfatidylethanolamine, zoals die door Rouser en medewerkers<sup>11</sup> in hersenen werd gevonden. Zij hebben verondersteld, dat deze vorm een natuurlijk voorkomend autoxidatieprodukt zou zijn. De afbraak van autoxidatieproducten

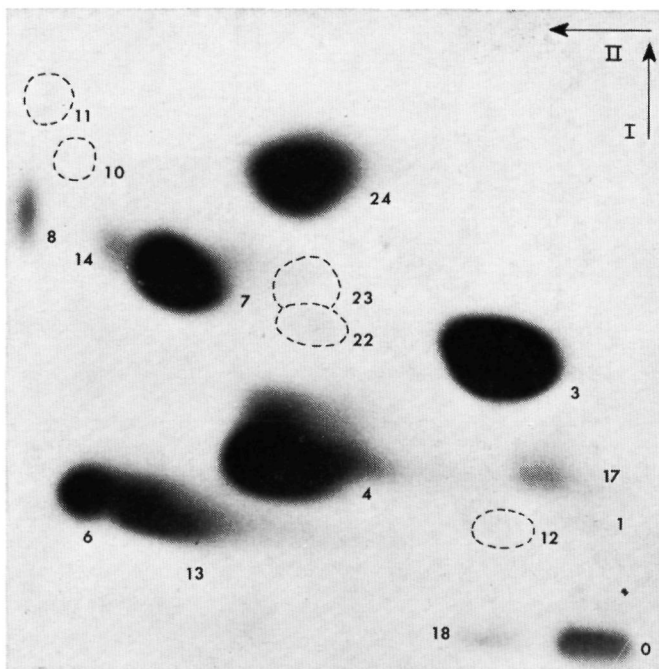


Fig. 5.1.b Autoradiogram van het dunnelaagchromatogram van Fig. 5.1.a.  
Identiteit van de vlekken: zie Fig. 5.1.a.

tot verbindingen, die zich als lysofosfatidylethanolamine gedragen, is beschreven door Dodge en Phillips<sup>10</sup>.

Di- en trifosfoinositiden konden alleen worden aangetoond na incubaties van lenzen met  $^{32}\text{P}_i$ , omdat hun concentraties zeer laag waren. Een autoradiogram van het gecombineerde chromatogram-electroferogram vertoonde twee vlekken met  $R_F$ -waarden, welke correspondeerden met die van standaarden, welke hetzelfde werden behandeld.

### 5.3.2 *De fosfolipidenamenstelling van de menselijke lens*

De totale fosfolipidenconcentratie van de menselijke lens neemt sterk toe gedurende de eerste drie levensdecaden en daalt daarna langzaam. Er is geen significant verschil in de totale fosfolipidenconcentratie tussen normale en seniele corticale cataracten op ca. 70-jarige leeftijd (Fig. 5.2). Kahán en Vass<sup>12</sup> vonden dat deze concentratie daalde tot een leeftijd van 50 jaar en dat hij vervolgens weer steeg. Dit is juist het omgekeerde van onze bevindingen. Hun conclusie was echter gebaseerd op de analyse van cataracten van verschillende

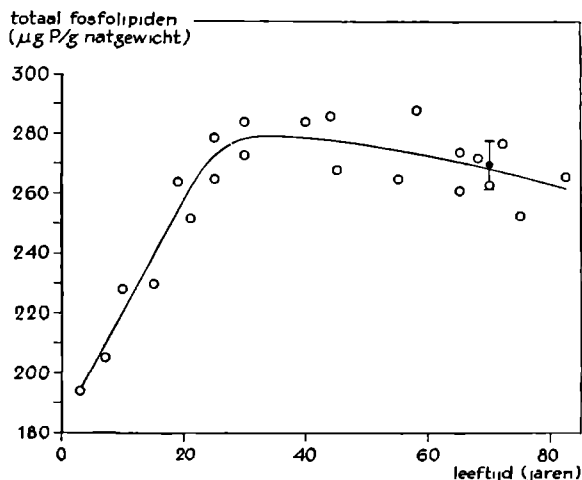


FIG. 5.2 Het verband tussen de leeftijd en de totale fosfolipidenconcentratie in de normale menselijke lens. De fosfolipidenconcentratie in de seniele cataract (op 65-75-jarige leeftijd) is eveneens aangegeven (zwarte punt, met S D)

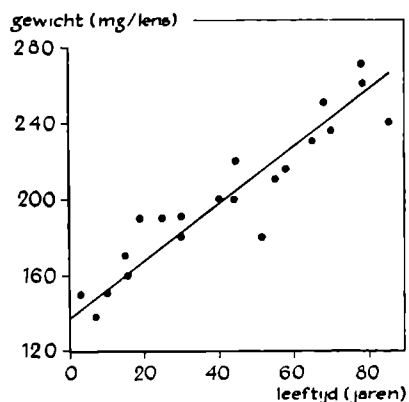


FIG. 5.3 Het verband tussen de leeftijd en het natgewicht van de normale menselijke lens ( $r = 0,95$ ).

typen en stadia en de lensgewichten correleerden nauwelijks met de leeftijd. Het verband tussen leeftijd en gewicht van de normale lenzen, welke in onze studie werden gebruikt is in Fig. 5.3 uitgezet. Tussen 5- en 80-jarige leeftijd neemt het lensgewicht vrijwel evenredig toe met de leeftijd van ca. 140 tot 254 mg. De grafiek en de spreiding van de waarden komen overeen met die welke door Johansen<sup>13</sup> en door Metha en Maisel<sup>14</sup> werden verkregen.

In Fig. 5.4 is de fosfolipidensamenstelling van de menselijke lens uitgezet

tegen de leeftijd. Sfingomyeline, fosfatidylethanolamine en lysofosfatidylethanolamine zijn kwantitatief de belangrijkste fosfolipiden. Hun relatieve concentraties veranderen sterk met de leeftijd. Lysofosfatidylcholine en fosfatidylinositol zijn in geringe hoeveelheden aanwezig. Hun percentages zijn constant. Fosfatidylserine, fosfatidylcholine en de niet-geïdentificeerde component U nemen een middenpositie in. De percentages van U en lysofosfatidylethanolamine nemen gedurende de eerste drie levensdecaden toe, terwijl die van fosfatidylserine, fosfatidylethanolamine en fosfatidylcholine sterk afnemen.

Onze waarden voor sfingomyeline, fosfatidylethanolamine, fosfatidylcholine en fosfatidylserine in lenzen van ongeveer 70 jaar komen vrij goed overeen

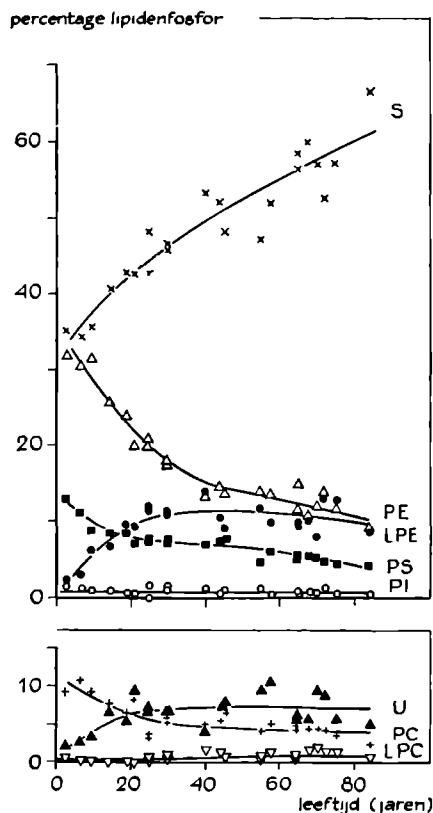


FIG. 5 4 De verandering van de procentuele fosfolipidensamenstelling van de normale menselijke lens met de leeftijd. Afkortingen: S, sfingomyeline; PE, fosfatidylethanolamine (met ethanolamineplasmalooen); PS, fosfatidylserine; PI, fosfatidylinositol; U, niet-geïdentificeerde component; PC, fosfatidylcholine (met cholineplasmalooen); LPC, lysofosfatidylcholine.



met die van Feldman, Feldman en Rouser<sup>15</sup>. Deze auteurs hebben in hun publikatie de leeftijd verwaarloosd (G. L. Feldman, persoonlijke mededeling), maar deze bedroeg voor de drie lenzen gemiddeld ongeveer 65 jaar, zodat een vergelijking gerechtvaardigd is. Zij vonden hogere waarden voor fosfatidylinositol (10,9–12,7 %) en fosfatidezuur (4,7–7,2 %, zie Tabel II) terwijl lysofosfatidylethanolamine en een verbinding als U niet gevonden werden. Daar de  $R_F$ -waarden van de lysoverbinding in veel chromatografische systemen overeenkomen met die van fosfatidylinositol, terwijl hetzelfde geldt voor U en fosfatidezuur, is het mogelijk, dat de genoemde hogere waarden van Feldman en medewerkers veroorzaakt werden door het twee aan twee samenvallen van deze componenten.

De veranderingen in de relatieve concentraties van fosfatidylcholine, fosfatidylserine, de ethanolaminefosfolipiden en U in de jonge lens (Fig. 5.4) zouden een ander groeipatroon kunnen weerspiegelen als dat in de oudere lens. Wanneer echter de veranderingen van de absolute concentraties (in  $\mu\text{g P/g}$  lens) worden uitgezet (Fig. 5.5) blijkt dat de serine-, inositol- en choline-glycerofosfolipiden een (vrijwel) rechte lijn geven. Dit geldt ook voor de som van de ethanolaminefosfolipiden, omdat de veranderingen in hun concentraties tegengesteld van aard zijn. Om deze reden is het waarschijnlijk, dat de lysoverbinding tijdens het leven van fosfatidylethanolamine wordt afgeleid. De concentratie van sfigomyeline neemt aanzienlijk toe, vooral tussen 3- en 40-jarige leeftijd. Dit betekent, dat er voortdurend een netto synthese van dit sfigolipide plaats vindt. De hoeveelheid sfigomyeline per lens neemt van 3- tot 65-jarige leeftijd tot bijna het viervoudige toe, nl. van 245  $\mu\text{g}$  tot 900  $\mu\text{g}$ . Deze laatste waarde is aanzienlijk lager dan 1,2 mg welke eerder voor de menselijke lens werd gepubliceerd<sup>18</sup>. De omstandigheden binnen de lens begunstigen blijkbaar de biosynthese van sfigolipiden, aangezien ceramidepolyhexosiden en gangliosiden eveneens in aanzienlijke hoeveelheden voorkomen<sup>16</sup>.

Wanneer men bedenkt, dat de totale eiwitconcentratie in de menselijke lens toeneemt van 235 mg/g in de eerste levensdecade tot 300 mg/g gedurende de vijfde en zesde decade<sup>14</sup>, dan blijkt, dat de veranderingen in de fosfolipidenconcentraties, uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  lipide-P/g eiwit, kwalitatief hetzelfde blijven. Vervolgens is het waarschijnlijk, dat alle lensfosfolipiden in de celmembranen gelocaliseerd zijn. Dit wordt gesteund door histologische onderzoeken<sup>17, 18</sup> en door het feit, dat de wateroplosbare kristallines geen lipidenfosfor bevatten, zoals door ons werd aangetoond. Albuminoid, het water-onoplosbare en ureum-oplosbare eiwit, dat van een of meer kristallines is afgeleid, bevat eveneens geen fosfolipiden. Bovendien toonden Lasser en Balasz<sup>19</sup> door middel van elektronenmicroscopie aan, dat het ureum-onoplosbare materiaal van de lens voornamelijk uit membranen bestond. Hieruit kan men concluderen, dat

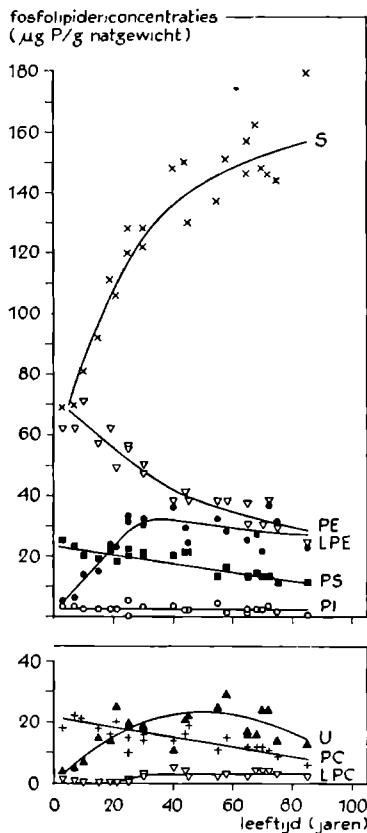


FIG. 5.5 De veranderingen van de fosfolipidenconcentraties in de normale lens met de leeftijd. Afkortingen als in Fig. 5.4.

de veranderingen in de fosfolipidenconcentraties, welke in Fig. 5.5 zijn weergegeven, geheel in de celmembranen plaats vinden.

Sommige fosfolipiden (difosfatidylglycerol, fosfatidezuur en fosfatidylglycerol) waren in zeer geringe hoeveelheden aanwezig (<1 %), zoals in kalfs- en rattelens. Voor deze lipiden kon geen duidelijke relatie tussen leeftijd en concentratie worden vastgesteld. Andere fosfolipiden kwamen in dermate geringe hoeveelheden voor, dat ze slechts na 24 uur lensincubatie met  $^{32}\text{P}_i$  konden worden gevonden met behulp van autoradiografie (Fig. 5.1). Enkele van deze componenten werden geïdentificeerd (zie 5.3.1), de andere werden niet verder bestudeerd.

De ethanolamine- en cholineplasmalogenen komen in de menselijke lens voor in lage concentraties. Hun percentages nemen toe ten opzichte van de overeen-

TABEL I

## DE PLASMALOGENEN VAN DE NORMALE MENSELIJKE LENS

De resultaten zijn verkregen na kwantitatieve twee-dimensionale dunnelaagchromatografie (2.6) in triplo van een extract van twee lenzen van iedere leeftijd (S.E. = 2 voor alle bepalingen). De waarden zijn uitgedrukt in percentages van respectievelijk het totale fosfatidylethanolamine en fosfatidylcholine gehalte.

De concentraties, uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  lipide-P/g natgewicht, zijn tussen haakjes aangegeven.

Fosfolipiden	19 jaar	30 jaar	64 jaar
Ethanolamineplasmalogeen	9 (5)	12 (6)	16 (5)
Cholineplasmalogeen	7 (1)	10 (2)	14 (2)

komstige diacylverbindingen (Tabel I). Dit kan verklaard worden uit hun metabolische stabiliteit, welke ook bleek uit de langzame  $^{32}\text{P}$ -inbouw in de kalfslensplasmalogenen.

### 5.3.3 De fosfolipidensamenstelling van lensdelen

Cortex en kern werden afzonderlijk geanalyseerd om te onderzoeken of de veranderingen in fosfolipidensamenstelling met de leeftijd waren gelokaliseerd in een van de beide delen of in de gehele lens. In jonge lenzen was het totaal lipidenfosfor in de 'cortex' hoger dan in de 'kern' (Tabel II). Dit verschil werd op hogere leeftijd misschien verkleind, doordat het corticale deel van de oude lenzen ook gedeelten van de kern kan hebben bevat. Oudere lenzen hebben namelijk een grotere kern en de gebruikte scheidingsmethode werd hieraan niet aangepast.

De percentages fosfatidylcholine en fosfatidylethanolamine in de 'cortex' zijn hoger dan in de 'kern'. Het verschil in fosfolipidenconcentratie tussen beide lensdelen wordt voornamelijk veroorzaakt door de verschillen in de concentraties van deze twee lipiden. Dit stemt overeen met de resultaten verkregen voor de kalfslens. De waarden voor fosfatidylinositol, lysofosfatidylcholine en U vertonen weinig samenhang met de leeftijd of met de plaats in de lens. Wanneer men de cortex beschouwt als het jongste lensweefsel, stemmen deze resultaten overeen met die van Fig. 4.4 voor de ouder wordende lens als geheel. Difosfatidylglycerol schijnt een belangrijker bestanddeel te zijn van de cortex dan van de kern. Uit analyses van kalfslensfracties bleek, dat dit lipide vooral in epitheel voorkomt. Deze hogere concentraties in de buitenste lenslagen zijn te verklaren uit de aanwezigheid van mitochondriën, welke relatief hoge concentraties difosfatidylglycerol bevatten.

De lage fosfatidylcholine-, fosfatidylserine- en fosfatidylethanolaminewaarden voor de oude lenskern verschillen opvallend van die voor andere weefsels. Zij suggereren een toenemend catabolisme van deze fosfolipiden in de ouder

TABEL II

## DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN DELEN VAN DE MENSELIJKE LENS OP VERSCHILLENDE LEEFTIJDEN

De waarden zijn uitgedrukt in procenten van het lipiden-P, dat teruggevonden werd na dunnelaagchromatografie. Ieder getal is het gemiddelde van 2 bepalingen van een extract van cortex of kern, verkregen van 2 lenzen van dezelfde leeftijd en van verschillende personen. De gemiddelde opbrengst ( $\pm$  S.D.) van de platen bedroeg 96,3 + 5,1%.

Gewichtsverhouding cortex : kern 2:1.

Fosfolipiden	20 jaar		32 jaar		66 jaar	
	cortex	kern	cortex	kern	cortex	kern
Sfingomyeline	40,7	56,6	46,5	55,7	58,0	66,4
Fosfatidylcholine	9,4	1,1	7,0	2,9	5,5	0,1
Fosfatidylethanolamine*	21,8	8,2	20,0	8,6	11,7	1,3
Fosfatidylserine	5,7	6,8	8,5	6,2	6,2	2,2
Fosfatidylinositol	0,8	0,4	0,4	0,3	0,1	0,5
Lysofosfatidylethanolamine	8,6	16,6	8,4	17,3	7,6	17,1
Lysofosfatidylcholine	3,4	1,2	0,9	2,1	1,3	2,1
Difosfatidylglycerol	1,4	0,2	0,7	0,3	0,3	0,2
Fosfatidyl-dimethylethanolamine	0,4	0,4	0,3	0,6	0,1	0,8
Fosfatidyl-monomethylethanolamine	—	0,2	—	0,2	—	0,1
Niet-geïdentificeerde component U**	5,2	5,0	6,1	4,8	5,8	6,1
Niet geïdentificeerd ***	2,6	3,3	1,2	1,0	3,4	3,1
Totaal lipiden-P ( $\mu$ g P/g natgewicht)	290	211	300	285	278	262

\* Bevat ook sporen (<0,1%) fosfatidylglycerol (zie ook Fig. 5.1).

\*\* Zie Fig. 5.1.

\*\*\* Zie Fig. 5.1. Bevat ook 0,1–1% fosfatidezuur.

wordende lens, welk voornamelijk in de binnenste lenslagen is gelocaliseerd. De accumulatie van sfingomyeline in de kern, zowel als in de cortex, is eveneens een merkwaardig verschijnsel. In 20-jarige lenzen is het verschil in sfingomyeline concentratie tussen kern en cortex kleiner dan in oudere lenzen. De resultaten suggereren, dat de sfingomyelinevorming het snelste verloopt in het centrale deel van de jonge lens.

Uit Tabel II blijkt vervolgens, dat op hogere leeftijd de verschillen tussen de fosfolipidenconcentraties in beide lensdelen (met uitzondering van die van sfingomyeline) groter worden, wanneer zij worden uitgedrukt op basis van het eiwitgehalte, omdat ouder lensmateriaal, zoals bekend is, een hoger eiwitgehalte heeft. Zolang echter de fosfolipidenconcentraties niet kunnen worden uitgedrukt op basis van lipiden-gebonden eiwit, waarschijnlijk hoofdzakelijk membraan-gebonden eiwit, leveren deze berekeningen weinig extra informatie, aangezien grotere hoeveelheden niet-structurele eiwitten (de kristallines) aanwezig zijn in variërende hoeveelheden. Tot op zekere hoogte lijken sommige veranderingen in lipidenamenstelling op die in hersenen. De resultaten van Svennerholm<sup>20</sup> voor de witte substantie en de hersenschors vertonen een soortgelijke relatie

voor de fosfatidylcholine- en sfingomyelinepercentages als die, welke uit het voorgaande blijkt (S-PC-relatie, zie 4.4.1). Bovendien lijken de stijgende concentraties van cholesterol en sfingomyeline bij het ouder worden van de lens op het myelinisatieproces<sup>21, 22</sup>. Waarschijnlijk zijn deze lipidenklassen samen met de glycolipiden in beide gevallen van vitaal belang wegens hun stabiliteit.

#### 5.3.4 Een vergelijking tussen de fosfolipidensamenstelling van menselijke en dierlijke lenzen

Zoals uit Tabel III blijkt, bestaat er ook voor de dierlijke lens een verband tussen fosfolipidensamenstelling en leeftijd, vooral ten aanzien van de hoofdcomponenten sfingomyeline en fosfatidylcholine (S-PC-relatie). Lysofosfatidylethanolamine en U werden op de plaat niet gevonden. Het zijn lipiden, die vooral in veel oudere lenzen aanwezig zijn, b.v. in apelenzen (zie hoofdstuk 4, Tabel I) en in menselijke lenzen (dit hoofdstuk, Tabel II). Voor de ratte- en de runderlenzen (Tabel III) en voor de verschillende kalfslensfracties (hoofdstuk 4, Tabel II) blijkt verder de fosfolipidenconcentratie af te nemen bij toename van de leeftijd, hetgeen in tegenstelling is met de gegevens voor de menselijke lens (Fig. 5.3). Het is niet duidelijk, wat de reden van dit verschil is. Mogelijk hangt dit samen met het verschil in de groeikarakteristieken. De runderlens neemt na 5 jaar niet meer in gewicht toe, terwijl hetzelfde geldt voor de konijnlenzen na 2 jaar (ref. 3, p.69 en 70) en volgens onze ervaring ook voor de rattelenzen na 2 jaar. Het gewicht van de menselijke lens daarentegen neemt evenredig met de leeftijd toe (Fig. 5.3),

TABEL III

DE INVLOED VAN DE LEEFTIJD OP DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN NORMALE DIERLIJKE LENZEN

De waarden zijn de gemiddelden van analyses in duplo van een extract van 12 rattelenzen of 6 kalfs- of runderlenzen. Opbrengst ( $\pm$  S.D.) na kwantitatieve dunnelaagchromatografie:  $98,7 \pm 2,6\%$ .

Leeftijd (maanden)	Lichaams- gewicht (g)	Totaal fosfolipiden ( $\mu$ g P/g lens)	Fosfolipidensamenstelling (mol-% P)*							
			S	PC	PI	PS	PE	DPG	PA	Rest
Rat	1,0	58	144	6	41	4	12	31	2	2
	1,5	110	123	7	43	3	12	33	0,5	2
	2,0	200	105	10	41	2	13	33	0,5	1
	3,5	304	105	12	38	2	14	31	0,5	2
	12	386	106	16	31	2	16	30	1	1
Kalf	2,5	—	72	18	32	2	12	33	0,5	1
Rund	36	—	46	24	25	3	13	34	0,5	1

\* Afkortingen: S, sfingomyeline; PC, fosfatidylcholine; PI, fosfatidylinositol; PS, fosfatidylserine; PE, fosfatidylethanolamine; DPG, difosfatidylglycerol; PA, fosfatidezuur; Rest, lysofosfatidylcholine, front en niet-geïdentificeerde componenten.

terwijl zijn fosfolipidenconcentratie (200–280 µg P/g) 2–4 maal hoger is dan die van deze diersoorten. Ondanks deze verschillen, passen de fosfatidylcholine- en sfingomyelinepercentages van de menselijke lens (Fig. 5.4) goed in de relatie tussen de leeftijd en deze percentages, welke door Tabel I van hoofdstuk 4 werd gesuggereerd voor verschillende dierlijke lenzen.

Onze resultaten, betreffende de fosfolipidensamenstelling van kalfs lensfracties en van ouder wordende dierlijke lenzen, zijn door recente publicaties van franse onderzoekers bevestigd<sup>23, 24</sup>. De auteurs gebruikten de door ons ontwikkelde technieken van fosfolipidenanalyse (hoofdstuk 2 en 3).

## 5.4 SAMENVATTING

1. De fosfolipidensamenstelling van de lens verandert tijdens het ouder worden. De concentratie van sfingomyeline stijgt, terwijl de concentraties van de andere fosfolipiden dalen. Deze veranderingen zijn gecorreleerd met het proces van de celdifferentiatie en de vorming van de lenskern.
2. De percentages sfingomyeline en lysofosfatidylethanolamine in de oudere menselijke lens zijn hoger dan die, welke ooit in andere weefsels werden gevonden. De fosfolipidenconcentratie in de jonge menselijke lens neemt toe, terwijl deze concentratie bij de rat en het rund afneemt.
3. Het gewicht van de menselijke lens blijft tijdens het leven voortdurend toenemen, terwijl bij lenzen van dieren een maximum schijnt te worden bereikt.

## LITERATUURREFERENTIES

1. S. LERMAN, *Cataracts*, C. C. Thomas, Springfield, 1964, p. 93.
2. M. GOLDSCHMIDT, *Biochem. Z.*, 127 (1922) 210.
3. J. NORDMANN, *Biologie du Cristallin*, Masson, Parijs, 1954, p. 122.
4. R. M. C. DAWSON en J. EICHBERG, *Biochem. J.*, 96 (1965) 634.
5. R. M. C. DAWSON, in G. V. Marinetti, *Lipid Chromatographic Analysis*, Vol. 1, M. Dekker, New York, 1967, p. 175.
6. G. B. ANSELL en T. CHOJNACKI, *Biochem. J.*, 98 (1966) 303.
7. C. ARTOM, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 15 (1964) 201.
8. D. REHBINDER en D. M. GREENBERG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 109 (1965) 110.
9. R. M. BROEKHUYSE, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 457.
10. J. T. DODGE en G. B. PHILLIPS, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 387.
11. G. ROUSER, G. KRITCHEVSKY, C. GALLI en D. HELLER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 215.
12. J. L. KAHÁN en Z. VASS, *Ophthalmologica*, 154 (1967) 551.
13. E. V. JOHANSEN, 1947, geciteerd door J. Nordmann, *Biologie du Cristallin*, Masson, Parijs, 1954, p. 72.
14. P. D. METHA en H. MAISEL, in M. U. Dardenne en J. Nordmann, *Biochemistry of the Eye*, Symp. Tutzing Castle, 1966, S. Karger, New York, 1968, p. 271.

15. G. L. FELDMAN, L. S. FELDMAN en G. ROUSER, *Lipids*, 1 (1966) 161.
16. G. L. FELDMAN, in M. U. Dardenne en J. Nordmann, *Biochemistry of the Eye*, Symp. Tutzing Castle, 1966, S. Karger, New York, 1968, p. 348.
17. J. E. A. VAN DEN HEUVEL, *Adv. Ophthalmol.*, 5 (1956) 54.
18. A. J. DARK, *Arch. Ophthalmol.*, 59 (1958) 676.
19. A. LASSER en E. A. BALAZS, in H. Bloemendal, *Report on the Symp. on The Biochemistry of the Lens*, Nijmegen, 1968, *Exp. Eye Res.*, 8 (1969) 227, Abstract II, 2.
20. L. SVENNERHOLM, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 570.
21. J. FOLCH-PI, in H. Waelsch, *Biochemistry of the Developing Nervous System*, New York, 1955, p. 121.
22. G. B. ANSELL en J. N. HAWTHORNE, *Phospholipids*, B.B.A. Library, Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 330.
23. B. Plazonnet, P. Bastide, P. Tronche en J. Komor, *C. R. Soc. Biol.* 162 (1968) 1800.
24. F. Klein en P. Mandel, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1967.

## VERANDERINGEN IN MEMBRAANSAMENSTELLING EN FOSFOLIPIDENMETABOLISME IN CATARACTEUZE LENZEN

### 6.1 INLEIDING

In hoofdstuk 6, 7 en 8 komt de vraag aan de orde, op welke wijze de fosfolipiden bij de vorming van de cataract betrokken zijn. Bij de keuze van het type cataract werd overwogen, dat de corticale cataract het meest geschikt is voor metabolische studies. De cortex kan namelijk gemakkelijk door isotopen bereikt worden. Bovendien zijn de troebelingen, welke bij proefdieren in de lens tengevolge van alloxandabetes of galactosemie ontstaan, goed te reproduceren. Belangrijk is ook, dat via operaties menselijke corticale cataracten kunnen worden verkregen. Op deze wijze zijn wij in staat een bijdrage te leveren aan het onderzoek naar het metabolisme van de menselijke lens, waarvan de kennis nog schaars is. In dit hoofdstuk worden de methodieken en inzichten, verkregen door bestudering van normale lenzen, toegepast op de suikercataracten bij de rat en op de seniele corticale cataract bij de mens. Hierbij zal het onderzoek van afwijkingen in de celmembranen en het fosfolipidenmetabolisme centraal staan.

### 6.2 MATERIALEN EN METHODEN

Lenzen met seniele corticale cataracten werden onmiddellijk na de cataractextractie gewogen en bij  $-25^{\circ}$  bewaard onder stikstof.

De fosfolipidensamenstelling veranderde niet tijdens het bewaren. De oorsprong van de normale menselijke lenzen werd in 5.2.1 beschreven. Het dierlijke materiaal en het opwekken van de experimentele cataracten werd in 2.2 en 2.3 samengevat.

De extractie van de lenslipiden vond plaats met behulp van chloroform-methanol-mengsels (5.2.2). Zwak gebonden lipiden werden geïsoleerd door drie extracties van de totale lens met 50 vol. (v/g) chloroform-diethylether (3:2). Het residu werd geëxtraheerd met chloroform-methanol-mengsels (5.2.2), waarna het extract met 0,1 M KCl werd gewassen en geconcentreerd, maar niet werd drooggedampt. Het aanwezige proteolipide-eiwit werd in een deel van het extract bepaald (2.10) en het andere deel werd herhaaldelijk droogge-



dampst met chloroform-water (1:1), gevolgd door afcentrifugeren in chloroform-methanol (1:1) van het geprecipiteerde proteolipide-eiwit. In het supernatant werd het totaal fosfolipiden bepaald. De incorporatie van  $^{32}\text{P}_i$  en  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol werd gemeten na 1 uur incubatie van de lenzen in Krebs-Ringer-medium (2.11 en 2.13). Verdere details zijn in hoofdstuk 2 beschreven.

## 6.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 6.3.1 Membraanverandering in de cataracteuze lens

De fosfolipidensamenstelling van normale menselijke lenzen en van seniele cataracten verschilt vrijwel niet (Tabel I). Hieruit kan men de conclusie trekken, dat de fosfolipidensamenstellingen van de cortices en de kernen van beide lens-typen eveneens overeenstemmen. Enkele metingen bevestigden dit. De resultaten stemden overeen met die van Tabel II, hoofdstuk 5. De sfingomyeline-concentratie in de cortex van seniele cataracten is volgens deze gegevens (zie Tabel II, hoofdstuk 5 en Tabel I van dit hoofdstuk) veel hoger dan de fosfatidylcholineconcentratie. Dit is in tegenspraak met de resultaten van Vass en Tapasztó<sup>1</sup>. Volgens deze auteurs zou fosfatidylcholine het belangrijkste fosfolipide in de cortex zijn. Hun afwijkende resultaten zijn waarschijnlijk te wijten aan een foutieve identificatieprocedure en een gebrek aan selectiviteit van de extractieprocedure, welke werd toegepast op de histologische coupes. Voorlopige analyses van rattelenzen, welke in galactose-cataractstadium 1, 2, 3 en 4 verkeerden, wezen uit, dat ook deze cataracten waarschijnlijk geen verandering in de fosfolipidensamenstelling brachten. Wanneer het gewicht van de lenzen ge-

TABEL I

#### DE FOSFOLIPIDENSAMENSTELLING VAN SENIELE CATARACTEN

De waarden zijn uitgedrukt in procenten ( $\pm$  S.D.) van het totaal lipiden-P, dat werd teruggevonden na dunnelaagchromatografie. Zij zijn het gemiddelde van waarden, verkregen door bepalingen van 6 afzonderlijke lenzen van iedere soort, in de leeftijdsgroep van 65-75 jaar.

Fosfolipiden	Normale lens	Seniele cataract
Sfingomyeline	56,7 $\pm$ 2,6	57,8 $\pm$ 2,4
Fosfatidylcholine	4,3 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,5*
Fosfatidylethanolamine	12,1 $\pm$ 1,6	12,6 $\pm$ 1,5
Fosfatitylserine	4,9 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,3
Fosfatidylinositol	0,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3
Lysofosfatidylethanolamine	10,5 $\pm$ 1,9	9,4 $\pm$ 1,7
U (niet-geïdentificeerd)	7,0 $\pm$ 1,6	8,3 $\pm$ 1,9
Andere fosfolipiden	3,9 $\pm$ 1,4	2,8 $\pm$ 1,3
Totaal lipiden-fosfor ( $\mu\text{g P/g natgewicht}$ )	266 $\pm$ 6	270 $\pm$ 8

\* Significant verlaagd percentage ( $p < 0,01$ ).

TABEL II

## DE GEBONDEN EN ONGEBONDEN LIPIDEN EN HET PROTEOLIPIDE-EIWIT IN CATARACTEN

Twee normale en twee seniele cataracteuze lenzen (60-70 jaar) werden met chloroform-ether ('zwak gebonden' lipiden) en vervolgens met chloroform-methanol geextraheerd. In het laatste extract werden het proteolipide-eiwit en de gebonden lipiden bepaald. In plaats van menselijke lenzen werden ook normale rattlelenzen en galactose cataracten (stadium 2) gebruikt. Deze werden direct met chloroform-methanol geextraheerd. Ieder getal werd berekend volgens het quotient:

$$\frac{\text{resultaat voor cataract}}{\text{resultaat voor normale lens}} \pm \text{S D (3 bepalingen)}$$

	Proteolipide-eiwit	Totaal cholesterol	Totaal lipide-P
<b>Menselijke lenzen</b>			
Chloroform-ether-extract	—	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Chloroform-methanol-extract	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>Rattlelenzen</b>			
Chloroform-methanol-extract	0,8 ± 0,1	—	—

corrigeerd werd op toename van het watergehalte, tengevolge van de zwelling, bleek de totale fosfolipidenconcentratie van deze lenzen gelijk te zijn aan die van normale lenzen.

De overeenstemming van de resultaten verkregen voor normale en cataracteuze lenzen is verwonderlijk, aangezien kon worden verwacht, dat een troebelings vergezeld zou zijn van een abnormale membraansamenstelling. De chloroform-methanol extractie maakte echter geen onderscheid tussen de zwak gebonden ('loosely bound'<sup>2</sup>) en de sterk gebonden lipiden. De gebruikte methode stelde ons evenmin in staat om de hoeveelheid proteolipiden te bepalen, de chloroform-methanol-oplosbare lipoproteïnen, welke een hoog gehalte aan lipiden en 'neutrale' aminozuren<sup>3</sup> hebben. Om deze informatie te verkrijgen werd een gemodificeerde extractieprocedure toegepast (6.2) en werden de relatieve hoeveelheden proteolipiden in cataracteuze en normale lenzen bepaald (Tabel II). In de menselijke cataract bleken de hoeveelheden zwak gebonden cholesterol en fosfolipiden te zijn toegenomen, terwijl zowel in de seniele cataract als in de galactosecataract de hoeveelheid proteolipide-eiwit in het chloroform-methanol extract verlaagd was ten opzichte van die van de overeenkomstige normale lenzen. Feldman vond soortgelijke resultaten uit de analyse van 'unbound' en 'bound' (d.w.z. proteolipiden-gebonden) lipiden<sup>4</sup>. Bij de onderzochte cataracten was waarschijnlijk sprake van het uit de membranen losraken van lipoproteïnecomplexen, waardoor de hierin aanwezige lipiden gemakkelijk voor extractie beschikbaar kwamen. Hierdoor steeg de hoeveelheid gemakkelijk-extraheerbaar cholesterol plus fosfolipiden. De resterende 'beschadigde'

celmembranen bevatten dientengevolge minder proteolipiden-'units', hetgeen tot uiting kwam in de verlaagde hoeveelheid proteolipide-eiwit in het chloroform-methanol-extract. Of hier sprake is van 'membraanbreuken', zoals deze voor de ernstige cataracten (stadium 3-4) beschreven zijn door Patterson en Bunting<sup>5</sup> (zie Fig. 1.4), is niet duidelijk. Tijdens de bewerking van deze tekst verscheen een elektronenmicroscopische studie van Kuwabara, Kinoshita en Cogan<sup>6</sup> (zie 1.3.3), waaruit bleek, dat reeds na 7 dagen galactosedieet membraanbreuken aanwezig waren diep in de equatoriale cortex. Dit is bij de plaats waar de eerste vacuolen gevormd worden. Te oordelen naar de gereproduceerde foto's is het aantal breuken echter gering. De grote verandering in de hoeveelheid proteolipiden laat zich hierdoor niet goed verklaren. Men kan zich echter wel voorstellen, dat de structurele componenten door de verhoogde spanning in de membranen aan dislocatie onderhevig zouden zijn, waardoor proteolipiden-eenheden zouden vrijkomen. Dit desintegratieproces zou het ontstaan van breuken bevorderen.

### 6.3.2 *Het fosfolipidenmetabolisme van menselijke en dierlijke cataracteuze lenzen*

De verdeling van de activiteiten van de fosfolipiden na incubatie van menselijke lenzen, welke onmiddellijk na enucleatie werden verkregen, is weergegeven in Tabel III. Fosfatidylinositol incorporeerde de meeste activiteit. Fosfatidezuur, fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine en fosfatidylglycerol zijn de andere gelabelde componenten. Een aantal zeer zwak gelabelde lipiden werd niet afzonderlijk bestudeerd. Het incorporatiepatroon, verkregen voor de normale menselijke lens is kwalitatief hetzelfde als dat van dierlijke lenzen na twee uur incubatie (hoofdstuk 4).

Een vergelijking tussen normale menselijke lenzen en seniele cataracten bracht enkele verschillen aan het licht. In cataracteuze lenzen was de incorporatie van <sup>32</sup>P in fosfatidylinositol 9% lager ( $p < 0,05$ ) en in fosfatidezuur 10% hoger ( $p < 0,05$ ) dan in de normale lens. De biosynthese van fosfatidylinositol uit zijn precursor fosfatidezuur werd blijkbaar geremd. De incorporatie in de choline- en ethanolamine-fosfolipiden was niet merkbaar veranderd. In de cataracten echter incorporeerde fosfatidylglycerol <sup>32</sup>P. Dit suggereerde, dat de precursor cytidine-difosfaat-diglyceride in grotere mate beschikbaar was voor de synthese van fosfatidylglycerol, indien de omzetting in fosfatidylinositol werd geremd (zie Fig. 1.1). De fosfatidylglycerolsynthese zou hierdoor versneld kunnen worden. Een andere mogelijkheid zou zijn, dat de specifieke activiteit van dit lipo-nucleotide en/of van het ingebouwde glycerofosfaat verhoogd was. Incorporatie van <sup>32</sup>P in difosfatidylglycerol vond nauwelijks plaats gedurende deze korte periode.

TABEL III

## DE FOSFAAT-TURNOVER VAN DE FOSFOLIPIDEN IN DE SENIELE CATARACT

Drie afzonderlijke lenzen van ieder type, van personen van 55-65 jaar, werden gedurende 3 uur met  $^{32}\text{P}_i$  geïncubeerd in Krebs-Ringer-bicarbonaat en daarna afzonderlijk geanalyseerd. Gemiddeld gewicht van de normale lenzen 239 mg en van de seniele cataracten: 248 mg (gezwollen). De waarden zijn percentages van het totaal lipiden- $^{32}\text{P}$  na dunnelaagchromatografie. Opbrengst van de plaat:  $94 \pm 3\%$ . De verhouding tussen het totaal-lipiden- $^{32}\text{P}$  en de activiteit van de water-methanolfase, beide in counts/min., zijn aangegeven als: lipiden- $^{32}\text{P}/^{32}\text{P}_i$ .

Fosfolipiden	$^{32}\text{P}$ -verdeling	
	normale lens	seniele cataract
Fosfatidezuur	19 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4
Fosfatidylinositol	59 $\pm$ 4	50 $\pm$ 5
Fosfatidylcholine	15 $\pm$ 2	13 $\pm$ 3
Fosfatidylethanolamine	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2
Fosfatidylglycerol	0	4 $\pm$ 1
Andere fosfolipiden	1 $\pm$ 1	0
$10^3$ . lipiden- $^{32}\text{P}/^{32}\text{P}_i$	3,4 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4

Om een vergelijking te kunnen maken met de experimentele suikercataract werden ratten met galactosecataracten (stadium I) ingespoten met  $^{32}\text{P}_i$ . Uit Tabel IV blijkt, dat het effect vergelijkbaar is met de seniele cataract bij de mens. De totale hoeveelheid geïncorporeerde activiteit was echter zeer laag. De reden hiervan werd reeds in hoofdstuk 4 uiteengezet. Daar de mogelijkheid bestond, dat het effect van de remming in vivo minder duidelijk naar voren kwam door de langdurige toevoer van geringe hoeveelheden  $^{32}\text{P}_i$ , werd het experiment in vitro herhaald. Hierbij werd tevens de invloed van het cataractstadium onderzocht. Er werd een korte incubatietijd gekozen, omdat uit voorstudies was

TABEL IV

DE  $^{32}\text{P}$ -INCORPORATIE IN DE FOSFOLIPIDEN VAN DE GALACTOSECATARACT IN VIVO

Ratten van 65-75 g kregen gedurende 3 dagen galactosehoudend (40 gew %) voedsel, waardoor de lens een corticale cataract kreeg (stadium I, zie Fig 1.4). Zij werden vervolgens intraperitoneaal met  $14 \mu\text{C } ^{32}\text{P}_i/\text{g}$  ingespoten. Na 6 uur werden de lenslipiden geïsoleerd. Het  $^{32}\text{P}$ -gehalte van de afzonderlijke fosfolipiden werd gemeten na twee-dimensionale dunnelaagchromatografie (opbrengst  $93 \pm 5\%$ ). Er werden 3 experimenten met 5 ratten van iedere soort uitgevoerd, met duplo bepalingen van ieder extract. De standaarddeviatie van het gemiddelde van de experimenten bedroeg 1 voor PA en 2 voor de overige percentages. De totale specifieke activiteit van de lensfosfolipiden is uitgedrukt in counts/min per  $\mu\text{g}$  lipiden-P.

Lenzen	Lipiden- $^{32}\text{P}$ (relatieve %)				Totale specifieke activiteit
	PA*	PI	PC	PE + PG	
Galactosecataracten	8	16	51	25	9
Normale lenzen	3	22	49	26	10

\* Afkortingen: PA, fosfatidezuur; PI, fosfatidylinositol; PC, fosfatidylcholine; PE, fosfatidylethanolamine, PG, fosfatidylglycerol.

TABEL V

DE  $^{32}\text{P}$ -INCORPORATIE IN DE FOSFOLIPIDEN VAN GALACTOSECATARACTEN IN VITRO

Alloxaan-diabetische en galactosecataracten in verschillende stadia (2.2 en Fig. 1.4) van ratten van 65–75 g werden gedurende 1 uur geïncubeerd in Krebs-Ringer-bicarbonaat. Elk vaatje bevatte 2,0 ml medium, 0,4  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}_i$  en 10 lenzen. Na incubatie werden de lenzen kort met 0,9% NaCl gewassen en geëxtraheerd. Acht ervan werden geanalyseerd zoals in Tabel IV werd beschreven. Twee lenzen werden gehomogeniseerd in 15% trichloorazijnzuur (TCA) en na centrifugeren en neutraliseren van het supernatant werd een monster genomen voor scintillatietelling. De activiteit van het TCA-extract van normale lenzen werd op 100 cpm gesteld. De waarden van 2 experimenten zijn gemiddeld. De S.D. voor metingen in duplo zijn per kolom aangegeven.

Lenzen	Cataract stadium	Lens gewicht (mg)	Lipiden- $^{32}\text{P}$ (relatieve %)				Totale specifieke activiteit (cpm/ $\mu\text{g}$ lipiden-P)	Relatieve activiteit per lens (cpm in TCA)
			PA*	PI	PC	PE+PG		
Normale lenzen	–	28,5	57	37	3	3	417	100
Galactosecataracten	1	31	76	18	1	6	370	89
Galactosecataracten	2	32	61	29	5	5	395	110
Galactosecataracten	3	33,5	56	34	3	7	409	105
Diabetische cataracten	1	31	60	30	6	4	425	98
S.D.	–	–	3	2	1	1	12	5

\* Afkortingen, zie Tabel IV.

gebleken, dat bij langere incubaties (3–5 uur) de invloed van de cataracteuze toestand op de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol geringer leek. De resultaten zijn weergegeven in Tabel V. De remming blijkt vooral in stadium 1 op te treden. De specifieke activiteit van fosfatidylinositol is dan ongeveer tweemaal zo klein als bij normale lenzen. In ernstiger lenstroebelingen, vooral in stadium 3, wordt het  $^{32}\text{P}$  van fosfatidezuur blijkbaar weer goed aan fosfatidylinositol doorgegeven. In dit stadium is nog slechts een geringe daling van de specifieke activiteit van fosfatidylinositol constateerbaar.

De activiteit van fosfatidylethanolamine plus fosfatidylglycerol is evenals bij de menselijke seniele cataract verhoogd. Uit visuele beoordeling van autoradiogrammen, welke van dunnelaagchromatogrammen werden gemaakt, blijkt, dat deze verhoging voornamelijk toegeschreven moet worden aan een toename van de activiteit van fosfatidylglycerol. Of hier ook sprake is van toename van de hoeveelheid fosfatidylglycerol kan uit de in 6.3.1 besproken analyses niet worden opgemaakt. De totale hoeveelheid  $^{32}\text{P}$ , welke in de fosfolipiden van een lens werd ingebouwd (specifieke activiteit) is in stadium 1 significant lager. In de volgende stadia stijgt deze hoeveelheid weer tot normale waarden. Hierbij valt op, dat de veranderingen in het fosfatidylinositolpercentage hiermee parallel lopen. Het is echter niet zo, dat de verlaging van de acti-

viteit van dit lipide tot uiting komt in de totale specifieke activiteit van de fosfolipiden, aangezien de veranderingen van de activiteiten van fosfatidylinositol en fosfatidezuur elkaar vrijwel compenseren. Wel bestaat een correlatie tussen de hoeveelheid in TCA opgeloste  $^{32}\text{P}$  en de hoeveelheid lipiden- $^{32}\text{P}$  bij de galactosecataracten. Dit zou er op kunnen duiden, dat het in de lens opgenomen  $^{32}\text{P}_i$  steeds voor een bepaald deel in de fosfolipiden wordt ingebouwd. Het ATP-gehalte van de galactosecataract daalt echter met het voortschrijden van de troebeling. In stadium 3 is dit gehalte 70% verlaagd<sup>7</sup>. De specifieke activiteit van de fosfolipiden is echter normaal (Tabel V), zodat de totale incorporatie onder deze omstandigheden blijkbaar onafhankelijk is van het ATP-gehalte. Aangezien de incorporatie hoofdzakelijk in het epitheel en de buitenste cortex plaats vindt (hoofdstuk 4, Tabel III), gelden de waarden van Tabel V voor de som van deze twee lenslagen. Meer details hieromtrent worden in hoofdstuk 8 besproken.

De diabetische cataract in stadium 1 gaf een soortgelijk incorporatiepatroon als de galactosecataract in stadium 2, terwijl de specifieke activiteit van de fosfolipiden enigszins hoger was dan bij de galactosecataracten in stadium 1 en 2. Het feit, dat de diabetische cataract zich langzamer ontwikkelt, terwijl in plaats van galactose het makkelijker te metaboliseren glucose wordt aangevoerd, zal hierbij waarschijnlijk een rol spelen. Belangrijk is de overeenkomst, die bestaat tussen de incorporatiepatronen van de menselijke seniele (corticale) cataract en de beide experimentele suikercataracten. Telkens treedt een remming van de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol op, terwijl de specifieke activiteit van fosfatidezuur met een ongeveer gelijke waarde toeneemt.

Teneinde het fosfatidylinositolmetabolisme (zie Fig. 1.1) nader te kunnen bestuderen, werden diabetische en galactosecataracten geïncubeerd met  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol, zoals in Tabel VI is beschreven. Uit de resultaten blijkt, dat het  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol in de suikercataracten meer dan twee maal sneller wordt inge-

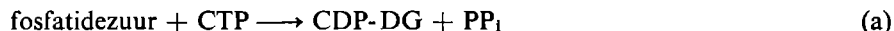
**TABEL VI**

DE INCORPORATIE VAN  $[^3\text{H}]$ -MYO-INOSITOL IN FOSFATIDYLINOSITOL VAN SUIKERCATARACTEN

Zes rattelenzen met een suikercataract en 6 normale lenzen werden geïncubeerd (zie Tabel V) met 20  $\mu\text{C}$   $[^3\text{H}]$ -myo-inositol per 2,0 ml medium gedurende 3 uur. Na extractie en kwantitatieve dunnelaagchromatografie werd zuiver fosfatidylinositol (PI) geïsoleerd en de geïncorporeerde activiteit gemeten. De afzonderlijke resultaten van 2 experimenten zijn weergegeven.

Lenzen	Gemiddeld lensgewicht (mg)	Cataract stadium	Specifieke activiteit (counts/min. per $\mu\text{g}$ PI)	
Normale lenzen	28	—	336	346
Galactosecataracten	31	I	749	768
Diabetische cataracten	30,5	I	410	433

bouwd in fosfatidylinositol dan in de normale lenzen. Dit kan niet duiden op een activering van de synthetiserende enzymen, aangezien  $^{32}\text{P}$  dan eveneens versneld zou moeten worden opgenomen via de reacties:



Het is daarom waarschijnlijk, dat de inositolconcentratie in de cataracten verlaagd is. Hierdoor wordt de specifieke activiteit van het vrije  $^3\text{H}$ -inositol in de lens verhoogd, hetgeen door inbouw leidt tot een verhoogde specifieke activiteit van het fosfatidylinositol (reactie b). Naar aanleiding hiervan is een onderzoek ingesteld naar de vrije inositolconcentratie in de lens en de invloed van de cataract hierop. De resultaten worden in hoofdstuk 7 besproken.

#### 6.4 SAMENVATTING

1. De fosfolipidensamenstelling van menselijke lenzen met een seniele corticale cataract en waarschijnlijk ook van rattelenzen in verschillende stadia van galactosecataract is gelijk aan die van de overeenkomstige normale lenzen van dezelfde leeftijd. De hoeveelheden gebonden lipiden en proteolipiden dalen echter in deze cataracten, hetgeen duidt op beschadiging van de membranen.
2. In vivo en in vitro daalt de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol in menselijke en dierlijke cataracten, terwijl die in fosfatidezuur en fosfatidylglycerol toeneemt. Bij incuberen van rijpe cataracten treedt dit effect minder duidelijk naar voren.
3. De  $^3\text{H}$ -myo-inositol-incorporatie in fosfatidylinositol in cataracten is aanzienlijk hoger dan in normale lenzen.

#### LITERATUURREFERENTIES

1. Z. VASS en J. TAPASZTÓ, *Acta Ophthalmol. Kbn.*, 45 (1967) 68.
2. A. K. PARPART en R. BALLENTINE, in E. S. Guzman Barron, *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*, Academic Press, New York, 1952, p. 135.
3. J. FOLCH-PI, *Fed. Proc.*, 23 (1964) 630.
4. G. L. FELDMAN, in M. U. Dardenne en J. Nordman, *Biochemistry of the Eye*, Symp. Tutzing Castle, 1966, S. Karger, New York, 1968, p. 348.
5. J. W. PATTERSON en K. W. BUNTING, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115 (1964) 1156.
6. T. KUWABARA, J. H. KINOSHITA en D. G. COGAN, *Invest. Ophthalmol.*, 8 (1969) 133.
7. TH. SIPPEL, *Invest. Ophthalmol.*, 5 (1966) 576.

## DE INOSITOLPERMEABILITEIT VAN DE CATARACTEUZE LENS

### 7.1 INLEIDING

Uit hoofdstuk 6 blijkt, dat in de corticale cataract de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidezuur is verhoogd en dat deze tegelijkertijd in fosfatidylinositol is verlaagd. Wanneer radioactief myo-inositol wordt toegediend, wordt dit versneld in het fosfatidylinositol van de cataracteuze lens ingebouwd. Dit suggereert, dat de inositolconcentratie zowel in de suikercataracten als in de menselijke seniele cataract verlaagd is. Deze hypothese wordt gesteund door de waarneming van Pirie<sup>1</sup>, dat in de seniele cataract een tendens bestaat tot een verlaagde inositolconcentratie en door het feit, dat dit hexitol versneld wordt uitgescheiden in de urine van diabetici<sup>2</sup>. Daarom werd een onderzoek ingesteld naar de lensinositolconcentratie en de opname- en efflux-snelheid van inositol in de experimentele suikercataract.

### 7.2 METHODEN

Het gehalte aan myo-inositol, sorbitol en galactitol werd bepaald in lenzen van diabetische en galactosemische vrouwelijke Wistar ratten van 60 g. Het voedsel en de wijze waarop de verhoogde aldosespiegels werden geïnduceerd zijn in 2.1 en 2.2 beschreven. Bloedglucose werd bepaald met glucoseoxidase aanwezig op Dextrostix en met de hexokinase/glucose-6-fosfaat dehydrogenase testcombinatie (2.14). Een glucosespiegel boven de 250 mg/100 ml werd als 'diabetisch' aangemerkt. Deze werd bij 50–60% van de dieren gevonden. De lenzen (ca. 500 mg) werden geëxtraheerd door homogeniseren in water bij kamertemperatuur. Het uiteindelijke totale volume bedroeg 16 ml. Hieraan werd toegevoegd 1 ml 0,3 N  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  en na mengen en 5 min. staan 1 ml 5%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , waarna opnieuw gemengd werd. De barium en de zinkoplossing waren te voren getitreerd volgens Fales<sup>3</sup>. Na 4 min. centrifugeren (3000 t.p.m.) werd 14 ml van het supernatant drooggedampt (45°, in vacuüm) in een met onverdund RBS-concentraat uitgekookte kolf, welke met 30%  $\text{HNO}_3$  en water werd nagespoeld. Het residu werd met water overgespoeld in een 1 ml spitsconische kolf, welke op dezelfde wijze werd gereinigd. Na droogdampen werd de kolf met droog  $\text{N}_2$  gevuld. Door toevoegen van 500  $\mu\text{l}$  Sil-prep en 2 uur schud-



den bij kamertemperatuur werden de hexitolen kwantitatief omgezet in hun trimethylsilyl-ethers<sup>4-7</sup>. De verkregen vloeistof werd na bezinken van wat vast materiaal in porties van ongeveer 100 µl (ijsgekoeld) in capillairen ingesmolten. Indien nodig werd de suspensie, met behulp van op KOH gedroogde pyridine en via drukfiltratie door een microglasfilter, overgebracht in een flesje voor weging. Hierna werd het volume berekend en werd de vloeistof ingesmolten. De trimethylsilyl-ethers werden door middel van gaschromatografie geanalyseerd. Hierbij werden zuiver (>99%) galactitol, sorbitol en myo-inositol als standaarden gebruikt. Het totale lenseiwit werd bepaald na homogeniseren in 10% trichloroazijnzuur, afcentrifugeren van het eiwit en wassen van het residu met ethanol en aceton<sup>8</sup>.

De opname van het [2-<sup>3</sup>H]-myo-inositol door lenzen werd gemeten na preïncubatie in media, welke 30 mM fructose (controle), glucose of galactose bevatten, gevolgd door incubatie met het radioactieve inositol. In sommige experimenten was 1 mM ouabaïne aanwezig. De zuiverheid van deze stof, berekend op basis van het drooggewicht, was 95-105%. De zuiverheid van het [<sup>3</sup>H]-myo-inositol werd als volgt getest. Papierchromatografie in ethylacetaat-pyridine-water (60:50:40) gaf een vlek, welke 99% van de activiteit bevatte. Gaschromatografie van de trimethylsilyl-ether gaf slechts één piek. De osmolariteit van de media werd bepaald door meting van de vriespuntsdaling<sup>9</sup>.

De inositol-efflux uit rattelenzen werd bepaald na preïncubatie met [<sup>3</sup>H]-myo-inositol in de media, welke ook voor de opname-experimenten werden gebruikt. Deze lenzen werden vervolgens geïncubeerd in media van dezelfde samenstelling als in de preïncubatieperiode, waarbij echter het radioactieve myo-inositol was vervangen door 10 mM koud myo-inositol om heropname van het actieve materiaal te voorkomen. De hexitolen werden geëxtraheerd (zie voorgaande) en de radioactiviteit in monsters van het extract werd gemeten na verschillende perioden met behulp van een scintillatie teller. Het watergehalte van de lenzen werd bepaald door het gewicht van het gewassen en gedroogde trichloroazijnzuurprecipitaat (zie voorgaande) af te trekken van het natgewicht<sup>8</sup>. Van gezwollen lenzen werd het gewicht van de controlelenzen afgetrokken om de toename van het watergehalte te meten. Vóór de incubatie stemden de gewichten binnen 1% met elkaar overeen.

## 7.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 7.3.1 *De hexitolen in de normale en de cataracteuze lens*

In Fig. 7.1 is de gaschromatografische scheiding van een mengsel van suikers en hexitolen weergegeven. Door het werk van Sweeley en medewerkers<sup>4</sup> werd

het mogelijk om deze thermolabele stoffen in stabiele trimethylsilylderivaten om te zetten. Dit gebeurt in een pyridineoplossing, welke hexamethyldisilazaan en trimethylchlorosilaan bevat. Bij kamertemperatuur is de reactie met de suikers dermate snel, dat na enkele minuten een analyse zou kunnen plaats vinden. Voor inositol vonden wij echter pas een volledige omzetting na 1 uur, zodat bij het onderzoek van lenshexitolen de reaktietijd veiligheidshalve op 2 uur werd gesteld.

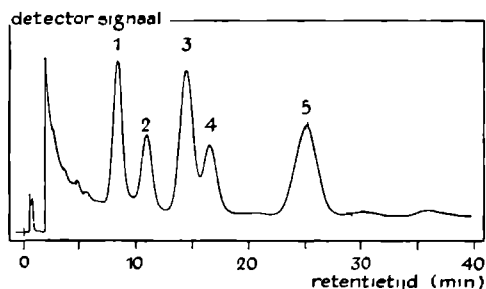


FIG. 7.1 De scheiding van suikers en hexitolen als trimethylsilylethers door middel van gaschromatografie. De kolom (305 cm x 1/8 inch) werd gestapeld met 1% UCW 98 op Dia-toport S (80–100 mesh). De gassnelheid bedroeg 12 ml/min., de oventemperatuur 185°. 1, fructose; 2,  $\alpha$ -glucose; 3, galactitol of sorbitol; 4,  $\beta$ -glucose; 5, myo-inositol.

Voor de gaschromatografische scheiding werd aanvankelijk Carbowax 20M als vloeistoffase gebruikt volgens Sawardeker en Sloneker<sup>10</sup>. De door deze auteurs aanbevolen conditionering van de kolom bij 245° gedurende 16 uur leidde tot ontleding van de Carbowax. De maximale temperatuur welke door ons werd toegepast was 200°. De kolom had een goede scheidingskarakteristiek. Van galactose werden drie derivaten gescheiden ( $\alpha$ - en  $\beta$ -pyranose en een furanosevorm, ' $\gamma$ -galactose'). Voor routinegebruik echter was de duur van een analyse bij 170° te lang (70 min. voor  $\beta$ -glucose), terwijl bij hogere temperaturen de isolering van galactitol niet goed mogelijk was.

De door Roberts en medewerkers<sup>7</sup> gebruikte temperatuurprogrammering op di-ethyleen-glycol-succinaat was een veelbevoevende methode voor de scheiding van de trimethylsilylethers van stoffen als glycerol, hexosen, hexitolen, ascorbinezuur en acetylhexosaminen. Het lensextract bleek echter op deze kolom bij hoge temperatuur een zeer complex beeld te leveren, hetgeen de gewenste analyse onmogelijk maakte. Een goede scheiding leverde UCW 98, een methyl-vinyl-silicon, welke de oorspronkelijk door Sweeley en medewerkers<sup>4</sup> toegepaste SE 52 in scheidingskarakteristiek dicht benaderde. Deze apolaire kolommen echter waren niet in staat sorbitol en galactitol te scheiden.

Daarom werd aangenomen, dat galactitol in de galactosecataract en sorbitol in de diabetische cataract<sup>1</sup> accumuleerde (1.3). Ook in de normale lens is de aanwezigheid van sorbitol meerdere malen aangetoond<sup>11</sup>. Op geen van de kolommen werden scyllo-inositol en myo-inosose-2 waargenomen. Deze stoffen zijn volgens Posternak en medewerkers<sup>12</sup> bij het metabolisme van myo-inositol betrokken. In een recente publikatie van Sherman en medewerkers<sup>13</sup> werden voor de lens concentraties van 0,3  $\mu\text{mol/kg}$  myo-inosose-2 en 0,59 mmol/kg scyllo-inositol vermeld.

Tabel I toont een afname van het myo-inositolgehalte van de lens in galactosemische ratten, terwijl tegelijkertijd het galactitolgehalte snel toeneemt. Na 6 dagen galactosedieet was ongeveer 95% van het myo-inositol uit de lens verdwenen. Het galactitolgehalte na 6 dagen kwam overeen met de waarden welke door Quan-Ma en Wells werd gevonden<sup>14</sup>. Uit hun werk bleek, dat galactitol bovendien accumuleerde in skeletspier en hartspier en in geringe mate ook in hersenen, nier, dunne darm en erythrocyten, maar niet in lever en plasma. Vanwege de lage permeabiliteit van de celwand voor suikerpolyolen<sup>15, 16</sup>, het ontbreken van galactitol in het plasma en de osmotische wateropname door met galactose gevoede lenzen (1.3), moet het galactitol in de cellen ontstaan zijn. Dit wordt door recente studies van Hayman en Kinoshita omtrent het voorkomen van aldose reductase in lensdelen<sup>15, 16</sup> en andere weefsels<sup>16</sup> bevestigd. Hieruit bleek, dat de aldose reductase-activiteit in lens, lever en nier ongeveer gelijk waren. De galactitolaccumulatie in de lens vond voornamelijk plaats in het epitheel, hetgeen correspondeerde met de hoge aldose reductase-activiteit in dit weefsel<sup>16</sup>. De metingen welke door ons verricht werden hebben de bevindingen van Hayman en medewerkers bevestigd (hoofdstuk 8).

Bij diabetische dieren werd eveneens een daling van het myo-inositolgehalte van de lens gevonden (Tabel I) gecombineerd met een stijging van het sorbitol-

**TABEL I**

**DE HEXITOLCONCENTRATIES IN LENZEN VAN DIABETISCHE EN GALACTOSEMISCHE RATTEN**

De hexitolen werden bepaald door middel van gaschromatografie na omzetting in trimethylsilyl-ethers. Omstandigheden: zie Fig. 7.1. De resultaten zijn uitgedrukt in  $\mu\text{mol/g}$  eiwit. Iedere waarde is het gemiddelde van twee duplo bepalingen van twee groepen van 8 lenzen. De standaarddeviatie van het gemiddelde in duplo metingen bedroeg 0,5 voor myo-inositol en 4 voor de overige waarden.

Aantal dagen hoge bloedaldose concentratie	Galactosemische ratten		Diabetische ratten	
	Myo-inositol	Galactitol	Myo-inositol	Sorbitol
0	6,4	0	7,0	5
3	1,7	107	4,5	85
6	0,3	164	1,9	147
10	—	—	0,8	152

TABEL II

DE [ $^3\text{H}$ ]-MYO-INOSITOLOPNAME DOOR LENZEN ONDER CATARACTOGENE OMSTANDIGHEDEN

De media werden als volgt samengesteld: 9 vol. Krebs-Ringer-bicarbonaat werden gemengd met 1 vol. 300 mM glucose, galactose of fructose. Behalve de 30 mM van deze hexosen was 5 mM glucose in alle gevallen aanwezig. Een hypotoon medium werd bereid door de NaCl-concentratie in het 30 mM-fructose medium te verminderen. In experimenten met osmotisch gecompenseerde media werden toenemende hoeveelheden sorbitol (30, 60, 90 en 120 mM) toegevoegd. Vier lenzen werden geïncubeerd in 10 ml van ieder medium. De media werden vernieuwd na 4, 8, 12 en 21 uur. Na 21 uur werden 2 lenzen gedurende 2 uur geïncubeerd in 2 ml van elk medium met 5  $\mu\text{C}$  [ $2\text{-}^3\text{H}$ ]-myo-inositol. De resultaten zijn de gemiddelden (+ de standaardfout) van 3 experimenten in duplo.

Medium	Osmotische waarde (mosM)	$10^3$ Counts/min. per ml lenswater
Fructose (controle)	304	$94,1 \pm 5,5$
Glucose	304	$38,4 \pm 2,4$
Galactose	304	$23,8 \pm 2,2$
Galactose (hypertoon medium)	334-424	$92,7 \pm 5,6$
Hypotoon medium	275	$75,6 \pm 5,1$

gehalte. In overeenstemming met de langzamer toename van sorbitol, daalde het myo-inositolgehalte ook langzamer dan bij de galactosecataract. Een afname van het myo-inositolgehalte werd ook door Pirie<sup>1</sup> in de lens van diabetici op hogere leeftijd gevonden en in lenzen van konijnen met een röntgencataract. Een gemeenschappelijk verschijnsel van al deze cataracten was de toename van het watergehalte van de lens.

### 7.3.2 De opname van myo-inositol door de cataracteuze lens

Kinoshita, Merola en Hayman<sup>8</sup> vonden, dat de toegenomen hydratatie in de eerste plaats verantwoordelijk was voor het verlies aan efficiëntie van het aminozuren-concentrerende mechanisme. Deze resultaten, gecombineerd met onze gegevens voor het lensinositol, brachten ons tot een onderzoek van de opname van myo-inositol door de lens.

Uit de resultaten in Tabel II blijkt, dat het mechanisme, dat myo-inositol concentreert in de lens, wordt geremd door de aanwezigheid van hoge concentraties glucose of galactose. Indien 1 mM ouabaine aanwezig was, werd de inositolopname met 41% verlaagd in het controlemedium, met 42% in 30 mM glucose en met 26% in 30 mM galactose. Deze remming suggereert, dat de myo-inositol-accumulatie door de lens is gekoppeld aan de ouabaine-gevoelige kationenpomp. De remming van de myo-inositolopname in aanwezigheid van hoge glucose of galactoseconcentraties was analoog aan de remming van het aminozuurtransport onder deze omstandigheden<sup>8</sup>. In het galactosemedium kon de opname van myo-inositol worden genormaliseerd door geleidelijk de

toniciteit van het medium te verhogen door toevoegen van sorbitol, zoals door Kinoshita en medewerkers werd beschreven voor de aminozuuropname<sup>8</sup>. Verlaging van de toniciteit tot 275 mosM verminderde eveneens de opname van myo-inositol. Hieruit volgt, dat de inositolaccumulatie niet primair geremd werd door de aanwezigheid van galactitol of sorbitol op zich, maar door de osmotische zwelling tengevolge van hun aanwezigheid in hoge concentraties.

### 7.3.3 De efflux van myo-inositol uit de cataractieuze lens

Tegelijk met de verlaagde opname, bleek de efflux van myo-inositol te zijn verhoogd bij lenzen, welke werden geïncubeerd in de aanwezigheid van hoge galactoseconcentraties (Fig. 7.2). Een toename van de efflux kon ook hier worden voorkomen door osmotische compensatie. De geringere effluxtoename in het 30 mM glucose-houdende medium correspondeert met het langzame verlies van myo-inositol uit lenzen van diabetische ratten ten opzichte van galactose-cataracten (Tabel I).

De resultaten<sup>17</sup>, welke in dit hoofdstuk werden beschreven, verschenen tegelijk met het werk van Stewart en medewerkers<sup>18</sup>. Deze onderzoekers vonden eveneens een daling van het myo-inositolgehalte van de lens tegelijk met een

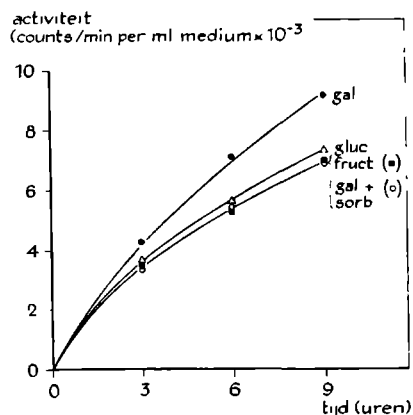


FIG. 7.2 De efflux van  $[2\text{-}^3\text{H}]$ -myo-inositol uit rattellenzen, welke geïncubeerd werden in media met hoge aldoseconcentraties (Tabel II). Twaalf lenzen ( $31,5 \pm 1,5$  mg) werden 16 uur gepreïncubeerd in 6 ml Krebs-Ringer-bicarbonaat (pH 7,4), welke 5 mM glucose en  $10 \mu\text{C}$   $[2\text{-}^3\text{H}]$ -myo-inositol bevatte. Daarna werden groepen van 3 lenzen geïncubeerd in 2 ml medium, welke 10 mM inactief myo-inositol bevatte. Dit medium werd na 3 en na 6 uur vervangen. De osmotisch gecompenseerde media werden bereid door sorbitol aan het 30 mM galactose-medium toe te voegen in de volgende hoeveelheden: van 0–3 uur 30 mM, van 3–6 uur 53 mM, van 6–9 uur 75 mM sorbitol. Afkortingen: gal., galactose; gluc., glucose; fruct., fructose; sorb., sorbitol.

stijging van het galactitolgehalte. Een verklaring werd niet gegeven. Van de andere weefsels, welke werden onderzocht bleek de inositolconcentratie alleen in nervus ischiaticus te zijn verlaagd en b.v. niet in lever, hart, nier en milt, hoewel de galactitolconcentratie in hart zeer hoog was: 29 mmol/kg; lens: 41 mmol/kg na 1 maand galactosedieet. Wanneer onze galactitolconcentratie berekend wordt per l lenswater bedraagt deze na 6 dagen ca. 82 mmol/l. Deze concentratie kan bij voortgezet dieet oplopen tot 100 mmol/l. Voor hart (77% water) wordt de concentratie in het weefselvocht ca. 38 mmol/l na 1 maand. Ook Quan-Ma en Wells vonden, dat hartspier (en skeletspier) op de lens na, de hoogste galactitolconcentraties vormden tengevolge van het galactosedieet<sup>14</sup>. Het grote verschil tussen lens en hart zou gelegen kunnen zijn in de activiteit van het enzym aldose reductase, welke in lens zeer hoog is en in hart laag. In lever en nier<sup>16</sup> is de activiteit echter veel hoger dan in hart, zodat men in deze organen een hogere galactitolconcentratie zou kunnen verwachten. Dat dit niet het geval is<sup>18</sup> kan misschien worden toegeschreven aan een lage activiteit van het enzym glucose-6-fosfaat dehydrogenase in deze organen, omdat via dit enzym NADPH wordt geproduceerd, dat voor de reductie van galactose gebruikt wordt (Fig. 1.3). Hayman en medewerkers<sup>16</sup> hebben aangetoond, dat de kern van de lens weliswaar een aanzienlijke aldose reductase-activiteit vertoont, maar door de extreem lage activiteit van glucose-6-fosfaat dehydrogenase een lage galactitolproductie heeft. In lensepitheel daarentegen hebben beide enzymen zeer hoge activiteiten, hetgeen bij galactosetoevoer tot zeer hoge galactitolconcentraties leidt. In een zeer recente publikatie heeft Hauser<sup>19</sup> eveneens het actief transport van myo-inositol beschreven. Dit bleek in niercoupes afhankelijk te zijn van de concentraties van Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> en Mg<sup>2+</sup>. Ouabaine werkte remmend.

De in dit hoofdstuk verkregen resultaten bevestigen, dat de in 6.3.2 besproken versnelde incorporatie van [<sup>3</sup>H]-myo-inositol in fosfatidylinositol van cataractieuze lenzen, het gevolg is van een verlaging van het lensinositolgehalte. De vraag of door deze verlaging de <sup>32</sup>P-incorporatie wordt vertraagd (6.3.2) of dat andere factoren een rol spelen, zal in hoofdstuk 8 worden behandeld.

#### 7.4 SAMENVATTING

1. Een gaschromatografische analyse van lenshexitolen wees uit, dat bij diabetische en galactosemische ratten het myo-inositolgehalte van de lens daalt, terwijl het gehalte aan sorbitol, respectievelijk galactitol sterk stijgt.
2. In het prevacuolaire stadium van de diabetische en de galactosecataract in vitro bleek, dat de myo-inositol-permeabiliteit sterk verandert. De myo-inositolopname wordt geremd, terwijl de efflux toeneemt.

3. Ouabaine remt het myo-inositoltransport in de lens, hetgeen suggereert, dat dit transport gekoppeld is aan de ouabaine-gevoelige kationenpomp.
4. Wanneer de zwelling van de lens in het prevacuolaire stadium van de suikercataract wordt verhinderd door osmotische compensatie van het medium met sorbitol, blijft de myo-inositol-permeabiliteit onveranderd. De permeabiliteitsveranderingen worden dus niet door de aanwezigheid van sorbitol of galactitol op zich veroorzaakt, maar door de osmotische wateropname, tengevolge van de accumulatie van deze hexitolen.

#### LITERATUURREFERENTIES

1. A. PIRIE, *Exp. Eye Res.*, 3 (1964) 124.
2. W. H. DAUGHADAY en J. LARNER, *J. Clin. Invest.*, 33 (1954) 326.
3. F. W. FALES, in D. Seligson, *Standard Methods in Clinical Chemistry*, Vol. 4, Academic Press, New York, 1963, p. 103.
4. C. C. SWEELY, R. BENTLY, M. MAKITA en W. W. WELLS, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
5. W. R. SUPINA, R. F. KRUPPA en R. S. HENLY, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 44 (1967) 74.
6. W. W. WELLS, T. A. PITTMAN en H. J. WELLS, *Anal. Biochem.*, 10 (1965) 450.
7. R. N. ROBERTS, J. A. JOHNSTON en B. W. FUHR, *Anal. Biochem.*, 10 (1965) 282.
8. J. H. KINOSHITA, L. O. MEROLA en S. HAYMAN, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 310.
9. R. L. BOUWMAN, H. V. TRANHAM en P. A. CAULFIELD, *J. Lab. Clin. Med.*, 43 (1954) 310.
10. J. S. SAWARDEKER en J. H. SLONEKER, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 945.
11. R. VAN HEYNINGEN, in H. Davson, *The Eye*, Vol. 1. Academic Press, New York, 1962, p. 227.
12. T. POSTERNAK, W. SCHOPFER, W. H. KAUFMANN-BOETSCH en S. EDWARDS, *Helv. Chim. Acta*, 46 (1963) 2676.
13. W. R. SHERMAN, M. A. STEWART, M. M. KURIEN en S. L. GOODWIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 158 (1968) 197.
14. R. QUAN-MA en W. W. WELLS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 20 (1965) 486.
15. S. HAYMAN en J. H. KINOSHITA, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 877.
16. S. HAYMAN, M. F. LOU, L. O. MEROLA en J. H. KINOSHITA, *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 474.
17. R. M. Broekhuysse, *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 269.
18. M. A. STEWART, M. M. KURIEN, W. R. SHERMAN en E. V. COTLIER, *J. Neurochem.*, 15 (1968) 941.
19. G. HAUSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 173 (1969) 257 en 267.

## DE BIOSYNTHESE VAN FOSFATIDYLINOSITOL IN DE NORMALE EN IN DE CATARACTEUEZE LENS

### 8.1 INLEIDING

Door de zwelling van de lens, welke in een cataractogeen medium optreedt, wordt de myo-inositolconcentratie sterk verlaagd (7.3). Tegelijkertijd treedt een remming op van de omzetting van fosfatidezuur in fosfatidylinositol (6.3.2). Door deze gegevens wordt gesuggereerd, dat een tekort aan inositol de fosfatidylinositol-synthese vermindert. De gemeten inbouw van [ $^3\text{H}$ ]-myo-inositol in fosfatidylinositol (6.3.2) schijnt er op te duiden, dat de synthese van dit lipide in de cataracteuze lens toch kan verlopen. Het is echter niet duidelijk, waarom bij toename van de lenstroebelings de remming van de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol geleidelijk verdwijnt (6.3.2). In dit hoofdstuk zijn de resultaten beschreven van een nader onderzoek van deze verschijnselen. De karakterisering van het fosfatidylinositolmetabolisme in de intacte lens, in lenshomogenaten en in subcellulaire fracties heeft geleid tot een mogelijke verklaring.

### 8.2 METHODEN

#### 8.2.1 *Incubaties van lenzen met $^{32}\text{P}_i$ in cataractogene media*

Kalfslenzen van ca 1,3 g werden in groepen van 3 in 45 ml medium gedurende 21 uur gepreincubeerd in media, welke 30 mM hexosen bevatten, teneinde de lenzen in het prevacuolaire stadium van cataract te brengen (2.13). Deze media werden samengesteld volgens 2.12.b. Een hypotoon en een hypertoon medium werden bereid door de NaCl-concentratie in het controlemedium te variëren. Osmotische compensatie bij galactitolaccumulatie in de lens werd bereikt door stijgende hoeveelheden sorbitol toe te voegen (hoofdstuk 7, Tabel II). De aldose reductase-remmer TMG (3,3-tetramethyleenglutaarzuur)<sup>1</sup> werd na neutraliseren aan het galactosemedium toegevoegd. Na 21 uur werden de media ververst. Per 3 lenzen werd 14 ml medium en 0,5 mC  $^{32}\text{P}_i$  toegevoegd, waarna 1 uur werd geïncubeerd. Hierna werden de lenzen snel gewassen met 0,9% NaCl en tot 0° gekoeld. Nadat het epitheel was verwijderd werd de lens bevroren en met behulp van een kurkeboor werd een equatoriale cortexring afgestoken van 1,5–2 mm dik (gewicht: 400–450 mg). Dit cortexmateriaal werd geëxtraheerd



met chloroform-methanol. In de extracten werd de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de fosfolipiden gemeten (2.5 en 2.9).

De concentraties van galactitol en inositol werden gemeten na extractie met water en eiwitprecipitatie met  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  en  $\text{ZnSO}_4$  (7.2).

### 8.2.2 *Incubatie van cortexhomogenaat met $^{32}\text{P}_i$*

Cortex werd gehomogeniseerd door het materiaal tweemaal uit een injectiespuit zonder naald te persen en vervolgens te potteren. Monsters van het homogenaat werden vermengd met CTP, water + CTP, of water, waarna  $^{32}\text{P}_i$  werd toegevoegd. In plaats van CTP werd ook  $\text{MgCl}_2$  gebruikt. Deze mengsels werden 30 min. bij  $37^\circ$  geïncubeerd.

### 8.2.3 *De bereiding van een microsomenfractie uit lenscortex*

Equatoriale lenscortices werden in een gelijk volume koude 0,25 M sucrose (met 1 mM EDTA) gehomogeniseerd in een potterbuis met teflon stamper. Vervolgens werd gecentrifugeerd (10 min., 10.000 x g) en uit het verkregen supernatant werd een microsomenfractie bereid door ultracentrifugering (1 uur, 100.000 x g). Door suspenderen van het sediment in sucrose en herhaling van beide centrifugeringen werden de microsomen gezuiverd. De microsomen van 100 cortices werden gesuspenderd in 300  $\mu\text{l}$  0,25 M sucrose (pH 7,4 met Tris). De microsomensuspensies werden bij  $-25^\circ$  bewaard en binnen enkele dagen gebruikt.

## 8.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 8.3.1 *De $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de fosfolipiden van de lenscortex in het prevacuolaire stadium*

De keuze van het equatoriale cortexweefsel als studieobject voor de vergelijking van de invloed van verschillende media, werd gedaan op grond van twee waarnemingen. Ten eerste: de eerste troebelingen bij galactosecataract in vitro en in vivo worden in de perifere cortex waargenomen; ten tweede: het fosfolipidenmetabolisme wordt na een nacht incuberen in een medium met 30 mM galactose het meest veranderd in de perifere cortex (zie Tabel I). De aard van deze verandering komt overeen met de waarnemingen bij andere cataracttypen (zie hoofdstuk 6, Tabellen III, IV en V). In de diepere cortexlagen worden geen duidelijke afwijkingen aangetroffen. Uit de resultaten blijkt, dat in het 30 mM galactosemedium de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol sterk vermindert is ten opzichte van het fructosemedium. De verlaging van het percentage wordt gecompenseerd door een vrijwel even grote verhoging in het percentage

TABEL I

DE  $^{32}\text{P}$ -INCORPORATIE IN DE FOSFOLIPIDEN VAN DE LENS CORTEX ONDER CATARACTOGENE OMSTANDIGHEDEN

Kalfslenzen werden in cataractogene media gepreincubeerd (zie 2 12 b). Na 21 uur werden de lenzen 1 uur geincubeerd met  $^{32}\text{P}_i$ , waarna de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in de cortexfosfolipiden werd gemeten. De waarden zijn het gemiddelde van 3 experimenten.

Medium	Osmolariteit (mosM)	Percentage van het totaal lipiden- $^{32}\text{P}$			Totale specifieke activiteit (cpm/ $\mu\text{g}$ lipiden-P)
		PA	PI	PC+PE+PG	
Fructose (controle)	295	71	26	3	133
Galactose	295	92	7*	1	111
Galactose + sorbitol	325-415	72	24	4	129
Galactose + TMG	295	73	25	2	137
Glucose	295	76	21*	3	146
Hypotoon medium	240	80	18*	2	115
Hypertoon medium	325	67	31*	2	135
Fructose + 1 mM ouabaïne	295	76	18*	6	130

\* De waarden zijn significant verschillend van het controlemedium ( $p < 0,05$ )

fosfatidezuur. Dit wijst op een verminderde overdracht van de fosfatidylgroep van fosfatidezuur naar fosfatidylinositol. Wanneer echter toenemende hoeveelheden sorbitol in het medium de verhoogde osmotische waarde binnen de lens (ten gevolge van galactitolvorming) compenseren, treedt geen zwelling op. Dit valt te constateren uit het constant blijven van het lensgewicht. Opmerkelijk hierbij is, dat de activiteitsverdeling gelijk is aan die bij het controlemedium. Dit suggereert, dat de zwelling van de lens de belangrijkste oorzakelijke factor is en dat de aanwezigheid van een verstoring van het metabolisme (1 3 2), tengevolge van de hoge galactoseconcentratie van het medium, niet primair van invloed is.

Het recente werk van Kinoshita c.s.<sup>2</sup> toonde aan, dat een zeer hoge aldose reductase-activiteit, gekoppeld aan een verhoogde NADPH-vorming door de hexosemonofosfaat-shunt, vooral in jong lensweefsel, een zeer snelle galactitolproductie veroorzaakt. Het staat vrijwel vast, dat de lenszwelling het gevolg is van de osmotische wateropname door de hoge galactitolconcentratie (1 3 2). De cortex welke door ons werd geanalyseerd verkeerde in het prevacuolaire stadium. Er waren dus geen troebelingen waarneembaar. Het elektronenmicroscopische onderzoek van Kuwabara, Kinoshita en Cogan<sup>3</sup> (1 3 3) toonde aan, dat in de rat na 3 dagen galactosedieet de eerste afwijkingen optraden in het epitheel en de oppervlakkig gelegen cortextlagen bij de kernboog. Deze afwijkingen bestonden voornamelijk uit toename van de hoeveelheid water, zowel binnen de cel (zwelling) als tussen de cellen (cystenvorming). Indien het juist

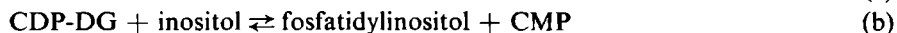
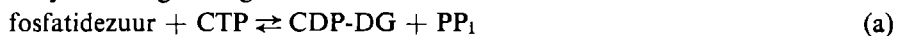
is, dat de extracellulaire waterophoping ontstaat door pogingen van de lenscellen om hun overmaat water te verwijderen, kan dit betekenen, dat in het prevacuolaire stadium de toename van het lenswater intracellulair plaats vindt. Dit correspondeert met de theorie van de osmotische wateropname, tengevolge van de hoge intracellulaire galactitolconcentratie.

Om te testen of de hoge galactoseconcentratie op zich van invloed was op de incorporatie van  $^{32}\text{P}$  in de fosfolipiden, werd de aldose reductase-remmer TMG (3,3-tetra-methyleenglutaarzuur) aan het medium toegevoegd. Hierdoor werd de galactitolvorming en dus ook de zwelling verhinderd. Het incorporatiepatroon bleek nu normaal te zijn (Tabel I). De invloed van een hoge glucoseconcentratie was minder duidelijk. Dit was waarschijnlijk te danken aan de relatief langzame accumulatie van sorbitol (dit hexitol wordt gedeeltelijk omgezet in fructose). Het effect van glucose op de myo-inositolpermeabiliteit bleek ook geringer (hoofdstuk 7).

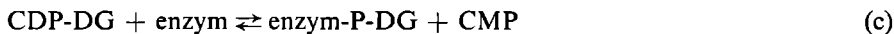
Om het effect van zwelling op zich te kunnen onderzoeken werd gebruik gemaakt van de resultaten van het werk van Kinoshita, Merola en Hayman<sup>4</sup> en van Cotlier, Kwan en Beaty<sup>5</sup>. Hierin werd aangetoond, dat de lens zich gedraagt als een perfecte osmometer binnen het 238–368 mosM-gebied van medium-osmolariteiten. Minimale lenszwelling resulteerde in hydroptische veranderingen in de cellen van het lensepitheel en van de cortex. Uit Tabel I blijkt, dat de invloed van het hypotone medium lijkt op die van het galactose medium. Toevoeging van 1 mM ouabaïne veroorzaakte eveneens lenszwelling en een hierbij passende verandering van het incorporatiepatroon. Een hypertoon medium daarentegen gaf een tegenovergesteld effect. Er trad een dehydratie van de lens op en een stijging van de specifieke activiteit van fosfatidylinositol. Uit een combinatie van gegevens van Tabel I volgt, dat zwelling primair de oorzaak is van de remming van de omzetting van fosfatidezuur in fosfatidylinositol.

### 8.3.2 *De invloed van CTP en $\text{Mg}^{2+}$ op het incorporatiepatroon van $^{32}\text{P}$ in de cortexfosfolipiden*

Het is tot nu toe niet duidelijk geworden op welke wijze de zwelling van de lens het metabolisme van fosfatidylinositol beïnvloedde. Een nadere analyse blijkt dus nodig te zijn. De reacties welke bij de incorporatie van  $^{32}\text{P}_i$  en  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol betrokken zijn, werden voor het eerst door Paulus en Kennedy<sup>6</sup> als volgt voorgesteld:



Tevens werd een door CDP-choline en CMP gestimuleerde inbouw van  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol geconstateerd (CTP afwezig), waarvoor het volgende reactiemechanisme werd gesuggereerd:



Reaktie (a) werd in 1966 in lever aangetoond<sup>7</sup> en in 1968 in *E. coli* (cytidine-trifosfaat:fosfatidezuur cytidyltransferase)<sup>8</sup>. Dat CDP-DG gevormd zou worden uit fosfatidylinositol en CMP werd door Petzold en Agranoff<sup>9</sup> voorgesteld, maar later weersproken<sup>6</sup>. CDP-DG is namelijk zelf nodig voor de fosfatidyl-inositol-vorming, zodat op deze wijze geen netto synthese zou plaats vinden. De biosynthese van fosfatidylinositol volgens het Kennedy-schema werd in 1967 eveneens voor de pancreas besproken (Prottey en Hawthorne<sup>10</sup>). Publicaties van Benjamins en Agranoff<sup>11</sup> beschreven de eigenschappen van het CDP-DG: inositol transferase (reaktie b) in hersenen. Hokin en Brown<sup>12</sup> onderzochten de stimulering van de fosfatidylinositol-synthese in hersencoupees.

Teneinde de in Tabel I en hoofdstuk 7 vermelde resultaten te kunnen verklaren werd in eerste instantie aan twee mogelijkheden gedacht:

1. Bij zwelling vermindert de inositolconcentratie tengevolge van een verhoogde efflux van inositol uit de lens en een verminderde opname. Reaktie (b) wordt dan belemmerd. Dit wordt door de resultaten van hoofdstuk 7 gesuggereerd.
2. Bij zwelling vermindert de CTP-concentratie, zodat reaktie (a) langzamer verloopt. Dit wordt gesuggereerd door de verlaging van de ATP-concentratie in de cataractueuze lens (Fig. 1.4).

Een combinatie van 1 en 2 was eveneens mogelijk. Tegen beide veronderstellingen bestonden echter bezwaren. In de galactosecataract bleek ook bij uiterst lage inositolconcentraties een sterke <sup>32</sup>P-incorporatie mogelijk (hoofdstuk 6, Tabel V), terwijl in deze cataract, in combinatie met een lage ATP-concentratie, tevens een lage CTP-concentratie waarschijnlijk was. Om hierin inzicht te verkrijgen werden kalfslenzen 21 uur geïncubeerd in media, welke 30 mM galactose en 30 mM fructose bevatten. Hierna werden de concentraties van inositol, galactitol en CTP gemeten in de cortex. De resultaten zijn in Tabel II vermeld. De hoeveelheden myo-inositol en CTP zijn ten opzichte van het lenseiwit niet veranderd. Dit betekent, dat de concentraties in het lenswater, bij de waargenomen stijging van het watergehalte (van 70 tot 77%), met 10% zijn gedaald. In het galactosemedium was de hoeveelheid galactitol in de cortex na 21 uur tot 32 mmol/kg eiwit gestegen. De hoeveelheid myo-inositol was hoger dan in de rattelens (hoofdstuk 7).

Naar aanleiding van deze gegevens werden cortexhomogenaten, waaraan CTP en/of water was toegevoegd, geïncubeerd met <sup>32</sup>P<sub>i</sub> (Tabel III). Toevoeging van water veroorzaakte een effect op de <sup>32</sup>P-incorporatie, dat vergelijkbaar was

TABEL II

## DE HOEVEELHEDEN HEXITOLEN EN CTP IN DE LENS CORTEX IN HET PREVACUOLAIRE STADIUM

Kalfslenzen werden geïncubeerd als werd beschreven in Tabel I. Na 21 uur werd de cortex geëxtraheerd en werden de hexitolen bepaald (zie hoofdstuk 7). CTP werd als fosfaat bepaald, na isolering door middel van dunnelaagchromatografie<sup>13</sup>. Lokalisatie vond plaats door merken met <sup>32</sup>P<sub>i</sub>, welke aan het incubatiemedium werd toegevoegd, gevolgd door autoradiografie. De resultaten zijn het gemiddelde van 3 experimenten met groepen van 6 lenzen. Voor het fructose (controle)-medium werd in de cortex een watergehalte van 70% in rekening gebracht en voor het galactose-medium 77% (hoofdstuk 7).

	Concentraties (mmol/kg eiwit ± S.D.)	
	30 mM Fructose	30 mM Galactose
Myo-inositol	33 ± 2	32 ± 2
Galactitol	—	32 ± 3
CTP	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,2

TABEL III

DE INCORPORATIE VAN <sup>32</sup>P<sub>i</sub> IN DE FOSFOLIPIDEN VAN CORTEXHOMOGENATEN

Monsters van 0,4 ml cortexhomogenaat bereid uit kalfslenzen werden bij 0° vermengd met 60 µl water en/of CTP tot een concentratie van 1 mM, of Mg<sup>2+</sup> tot 25 mM, waarna 0,1 mC <sup>32</sup>P<sub>i</sub> per ml werd toegevoegd. Deze mengsels werden 30 min. bij 37° geïncubeerd. Hierna werd een lipidenextract bereid en werden de totale specifieke activiteit van het lipiden-<sup>32</sup>P en de <sup>32</sup>P-incorporatie in de afzonderlijke fosfolipiden gemeten. De waarden zijn het gemiddelde van metingen van twee experimenten. De standaarddeviatie voor duplometingen is aangegeven.

Homogenaat	Percentage van totaal lipiden- <sup>32</sup> P				Tot. spec. act. (10 <sup>3</sup> cpm/µg P)
	PA	PI	PG	PE+PC	
Cortex	47	52	1	<0,1	1511
Cortex + H <sub>2</sub> O	52	47	1	<0,1	1532
Cortex + H <sub>2</sub> O + CTP	46	53	1	<0,1	1496
Cortex + CTP	33	66	1	<0,1	1485
Cortex + H <sub>2</sub> O + Mg <sup>2+</sup>	25	73	2	<0,1	1540
Cortex + Mg <sup>2+</sup>	22	75	2	1	1578
S.D.	1,5	1,5	0,5	—	74

met het effect in het prevacuolaire of het vroege cataracteuze stadium. Dit effect kon worden teniet gedaan door toevoegen van CTP tot een concentratie van 1 mM in het lenswater. Werd CTP gevoegd bij het onverdunde cortexhomogenaat, dan werd de overdracht van <sup>32</sup>P van fosfatidezuur aan fosfatidyl-inositol gestimuleerd (vergelijk Tabel I, hypertoon medium). Deze gegevens suggereren, dat CTP in de cortex een beperkende factor is van de fosfatidyl-inositol-synthese. Toevoeging van Mg<sup>2+</sup> gaf een soortgelijk effect, extra inositol had geen invloed. Het is dus waarschijnlijk, dat in het prevacuolaire stadium een soort 'verduunningseffect' optreedt (vgl. ook Fig. 1.4). De hierdoor veroorzaak-

te verlaging van de CTP- en de  $Mg^{2+}$ -concentratie in het lenswater zou de gevonden invloed op het incorporatiepatroon van  $^{32}P$  kunnen verklaren. Bij incubatie van de intacte lens in sommige cataractogene media (Tabel I) werd een grotere verandering van dit incorporatiepatroon gevonden dan in het homogenaat (Tabel III). Dit wijst er op, dat nog andere remmende factoren zouden kunnen zijn geïntroduceerd. Het verschil kan echter ook verklaard worden door de waarneming, dat kortere incubaties van cataracteuze rattelensen met  $^{32}P_i$  het remmend effect op de  $^{32}P$ -incorporatie in fosfatidylinositol duidelijker naar voren brengen (6.3.2): bij incubatie van de intacte kalflens moet  $^{32}P_i$  de cortex eerst penetreren, alvorens ingebouwd te kunnen worden. Bij incubatie van het homogenaat echter, wordt  $^{32}P_i$  onmiddellijk in het metabolisme ingevoerd. Vanwege de afmetingen zal deze tijdsinvloed bij de kalflens nog groter zijn dan bij de rattelens.

### 8.3.3 *Het fosfatidylinositolmetabolisme in cortexmicrosoomsystemen*

In stadium 2 en 3 werd een toenemende normalisering van het incorporatiepatroon van  $^{32}P$  in de fosfolipiden van de galactosecataract aangetoond (hoofdstuk 6, Tabel V). Juist in deze stadia echter werden lage concentraties van ATP en inositol gevonden (Fig. 1.4). Om hiervoor een verklaring te vinden werd het fosfatidylinositol-synthetiserende systeem aan een nader onderzoek onderworpen. Hiertoe werden cortexmicrosomen geïsoleerd en geïncubeerd onder verschillende omstandigheden. Uit Fig. 8.1 blijkt, dat het pH-optimum van de  $[^3H]$ -fosfatidylinositolvorming onder invloed van CTP bij 8 ligt. In Fig. 8.2 is de invloed van de metaalionconcentratie op de  $[^3H]$ -myo-inositol-incorporatie weergegeven, terwijl uit Tabel IV het effect blijkt van verschillende toevoegingen aan het hierbij gebruikte incubatiemedium.  $Mn^{2+}$  blijkt in lage concentraties (2 mM) effectiever te zijn dan  $Mg^{2+}$ , dat echter bij hogere concentraties (30–50 mM) een sterkere incorporatie levert en bij de gebruikte pH geen neerslagen geeft. Prottey en Hawthorne<sup>10</sup> vonden hetzelfde resultaat met pancreasmicrosomen. De door deze auteurs geconstateerde stimulering door albumine bleek bij lensmicrosomen niet op te treden. Tabel IV toont integendeel een remming.

Galactitol gaf onder deze omstandigheden geen remming, in tegenstelling tot de bevindingen van Wells en Wells<sup>14</sup> voor hersenmicrosomen. De na het afsluiten van onze experimenten verschenen publikatie van Benjamins en Agnoff<sup>11</sup>, betreffende de CDP-diglyceride:inositol transferase in hersenmicrosomen, weersprekt eveneens de resultaten van Wells en Wells<sup>14</sup>. Toevoegen van Tween 80 veroorzaakte in lensmicrosomen enige remming bij een concentratie, welke voor de CDP-diglyceride:inositol transferase-activiteit in hersenmicrosomen stimulerend was.

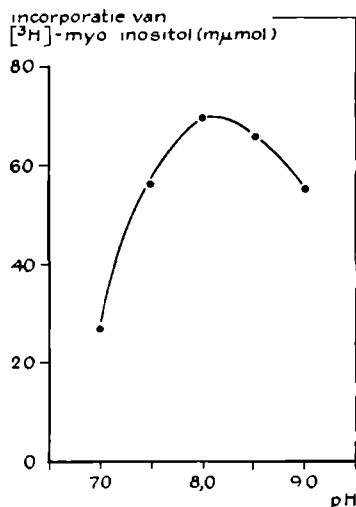


FIG 8.1 Het pH-optimum van de myo-inositol-incorporatie in fosfatidylinositol. Iedere buis bevatte 30  $\mu$ l microsomensuspensie, 0,14  $\mu$ mol [ $^3$ H]-myo-inositol en 100  $\mu$ l 0,1 M Tris-HCl buffer in een eindvolume van 140  $\mu$ l. De concentraties van CTP en  $MgCl_2$  bedroegen respectievelijk 1 mM en 30 mM. De pH werd gevarieerd zoals is aangegeven. De buizen werden 1 uur bij 37° geïncubeerd. Hierna werd 2 ml chloroform-methanol (1:1) toegevoegd. Na afcentrifugeren van het eiwit, werden 1 ml chloroform en 5 ml 0,1 M KCl aan het supernatant toegevoegd en werd opnieuw gecentrifugeerd. De chloroformfase werd nagewassen met 5 ml synthetische bovenfase (chloroform-methanol-water, 3:48:47), welke 0,02%  $CaCl_2$  en 0,09% inositol bevatte. De chloroformfasen werden bijna drooggedampt in telpotjes. De activiteit werd bepaald na toevoegen van 1 ml methanol en (na oplossen) 10 ml vloeistof van Bray. Met behulp van dunnelaagchromatografie en scintillatietelling werd aangetoond, dat al het [ $^3$ H]-lipide fosfatidylinositol was.

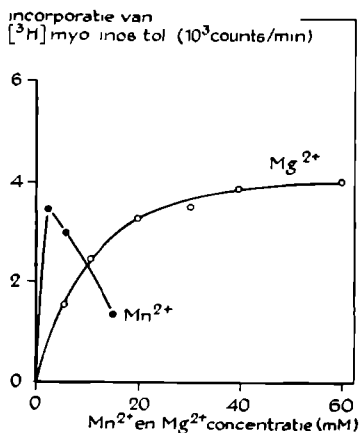


FIG 8.2 De invloed van de concentraties van  $Mg^{2+}$  en  $Mn^{2+}$  op de [ $^3$ H]-myo-inositolincorporatie in fosfatidylinositol. Omstandigheden als in Fig 8.1 bij pH 8,0, met uitzondering van de metaalionenconcentraties.

TABEL IV

DE INVLOED VAN TOEVOEGINGEN AAN HET MEDIUM OP DE  $[^3\text{H}]$ -MYO-INOSITOL-INCORPORATE IN FOSFATIDYLINOSITOL

Omstandigheden als in Fig. 8.1 bij pH 8,0. De waarden zijn het gemiddelde van bepalingen in triplo ( $\pm$  S.D.).

Toevoeging	Concentratie in het medium	Incorporatie (m $\mu$ mol)
Geen (controle)	—	75 $\pm$ 2
Galactitol	10 mM	74 $\pm$ 3
Galactitol	100 mM	73 $\pm$ 4
Galactose	10 mM	73 $\pm$ 2
Tween 80	5 $\mu$ g/ml	68 $\pm$ 2
Albumine	0,5 mg/ml	73 $\pm$ 2
Albumine	1,5 mg/ml	51 $\pm$ 3
Albumine	5 mg/ml	40 $\pm$ 2
CTP weggelaten	0	15 $\pm$ 2
CMP i.p.v. CTP	2 mM	49 $\pm$ 3

Opmerkelijk was de incorporatie van  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol, welke zonder CTP plaats vond en welke bij pH 8 een vijfde bedroeg van de door CTP gestimuleerde incorporatie. Dit was een aanwijzing, dat de door Paulus en Kennedy<sup>6</sup> gesuggereerde 'uitwisselingsreactie' ook bij lensmicrosomen verliep. De stimulering door CMP bevestigde dit. Het optimum voor de  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol-incorporatie zonder CTP lag bij pH 7 (Fig. 8.3). Dit zou het optimum

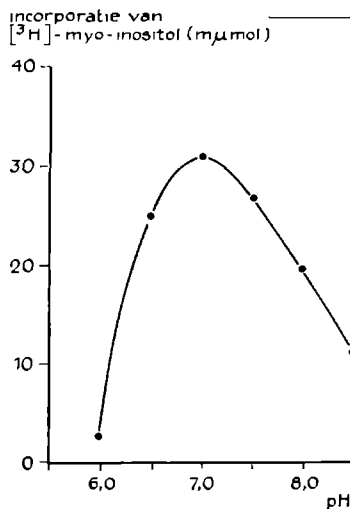


FIG. 8.3 Het pH-optimum voor de  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol-incorporatie in fosfatidylinositol bij afwezigheid van CTP. Omstandigheden als in Fig. 8.1, echter met 0,1 M Tris-maleaat-buffer van de aangegeven pH.



voor reactie (d) kunnen zijn. Uit vergelijking van de incorporatie met en zonder CTP (Fig. 8.1 en 8.3) blijkt, dat bij een fysiologische pH de 'uitwisselingsreactie' een aanzienlijk deel van de incorporatie verzorgt. Hoeveel dit in vivo is, zal vooral afhankelijk zijn van de concentraties van CTP, CMP en inositol.

Aan de hand van deze gegevens kan de volgende hypothese worden opgesteld omtrent het metabolisme van fosfatidylinositol in de cataractieuze lens in de stadia 2 en 3. Bij het zwellen van de lens daalt de inositolconcentratie. In het gevorderde cataractstadium nadert deze concentratie tot nul. De ATP-concentratie wordt eveneens sterk verlaagd, zodat de fosforylering van CMP vermindert. Hierdoor kan de CMP:CTP-verhouding stijgen. Zowel door deze stijging als wel door daling van de inositolconcentratie kan de uitwisselingsreactie gestimuleerd worden. Hierdoor kan de incorporatie van  $^{32}\text{P}$  uit [ $^{32}\text{P}$ ]-fosfatidezuur, welke in het prevacuolaire stadium geremd is, in latere stadia weer stijgen, zoals in Tabel V, hoofdstuk 6 werd vastgesteld.

#### 8.4 SAMENVATTING

1. Uit incubaties van kalfslenzen in cataractogene media blijkt, dat zwelling de oorzaak is van de remming van de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol in de cortex. Dit verklaart het optreden van deze remming in verschillende soorten van cataract bij mens en dier.
2. CTP en  $\text{Mg}^{2+}$  zijn beperkende factoren bij de  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol in de lenscortex. Zwelling in het prevacuolaire cataractstadium blijkt het totale CTP-gehalte van de cortex niet te verlagen, maar wel de CTP-concentratie in het lenswater. Hetzelfde geldt waarschijnlijk voor  $\text{Mg}^{2+}$ . Dit zou verminderde  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol in dit stadium kunnen verklaren.
3. In het microsomale systeem van de lens komt naast de synthese van fosfatidylinositol (optimale pH 8,0) ook een door CMP gestimuleerde 'uitwisseling' van myo-inositol voor (optimale pH 7,0). Deze kan bij een fysiologische pH een belangrijke bijdrage leveren aan de incorporatie van precursors als  $^{32}\text{P}_i$  en [ $^3\text{H}$ ]-myo-inositol. Ook in het gevorderde stadium van cataract speelt deze 'uitwisselingsreactie' mogelijk een belangrijke rol.

1. J. H. KINOSHITA, D. DVORNIK, M. KRAML en K. H. GABBAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 158 (1968) 472.
2. S. HAYMAN, M. F. LOU, L. O. MEROLA en J. H. KINOSHITA, *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 474
3. T. KUWABARA, J. H. KINOSHITA en D. G. COGAN, *Invest. Ophthalmol.*, 8 (1969) 133.
4. J. H. KINOSHITA, L. O. MEROLA en S. HAYMAN, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 310.
5. E. COTLIER, B. KWAN en C. BEATY, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 705.
6. H. PAULUS en E. P. KENNEDY, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1303.
7. J. R. CARTER en E. P. KENNEDY, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 678
8. J. R. CARTER, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 748
9. G. L. PETZOLD en B. W. AGRONOFF, *Federation Proc.*, 24 (1965) 476.
10. C. PROTTEY en J. N. HAWTHORNE, *Biochem. J.*, 105 (1967) 369
11. J. A. BENJAMINS en B. W. AGRONOFF, *J. Neurochem.*, 16 (1969) 513.
12. M. R. HOKIN en D. F. BROWN, *J. Neurochem.*, 16 (1969) 475.
13. C. V. COLE en C. ROSS, *Anal. Biochem.*, 17 (1966) 526
14. H. J. WELLS en W. W. WELLS, *Biochemistry*, 6 (1967) 1168.

De lens bevat slechts twee celsoorten: epitheelcellen en vezels en is een van de zeldzame organen, welke geheel onbeschadigd geïsoleerd en in leven gehouden kunnen worden in een eenvoudig medium. Om deze redenen houden vele specialismen zich met het onderzoek van de lens bezig: morfologie en embryologie (celdifferentiatie), eiwitchemie en immunochemie (synthese en karakterisering van eiwitten), pathologie en biochemie (cataract, suikermetabolisme en actief transport).

Op grond van de belangrijke rol, die de celmembranen van de lens bij vrijwel elke van deze terreinen vervullen, werd een studie ondernomen van een groep belangrijke bouwstenen van deze membranen: de fosfolipiden. In dit proefschrift wordt de invloed van diersoort, leeftijd, celdifferentiatie en cataract op de fosfolipidensamenstelling van de lens beschreven. Deze samenstelling wordt vergeleken met die van andere weefsels van het oog. Tevens worden de resultaten besproken van een onderzoek naar de invloed van de cataractieuze toestand op het actieve myo-inositoltransport en het metabolisme van fosfatidyl-inositol.

In hoofdstuk 1 is een samenvatting gegeven van onze huidige kennis van de samenstelling van de lenslipiden, het energiemetabolisme en het actief transport, de diabetische en de galactosecataract en tenslotte de ultrastructuur van de galactosecataract.

De toegepaste methodieken, waarvan de microanalyse van fosfolipiden in eigen laboratorium werd ontwikkeld, zijn beschreven in hoofdstuk 2.

Hoofdstuk 3 geeft een overzicht van de karakterisering van een twaalfstal fosfolipiden uit retina, iris, choroidea, lens, cornea, sclera en glasachtig lichaam. De met  $^{32}\text{P}$  gemerkte diacyl- en vinyl ether-fosfolipiden werden geïdentificeerd door chromatografische vergelijking van hun hydrolyseprodukten met standaardstoffen. In alle oogweefsels waren de volgende fosfolipiden kwantitatief de belangrijkste: fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine, ethanolamineplasmalogueen, fosfatidylserine, sfingomyeline en fosfatidylinositol. De volgende componenten kwamen in geringe hoeveelheden voor: fosfatidylglycerol, cardiolipine, fosfatidezuur, cholineplasmalogueen, lysofosfatidylcholine, enkele niet-geïdentificeerde fosfolipiden en vermoedelijk glyceryl etherfosfolipiden.

In hoofdstuk 4 worden de samenstelling en het metabolisme beschreven van de fosfolipiden in normale dierlijke lenzen. De fosfolipidengehalten van de verschillende lenssoorten en van de kalfslensfracties (epitheel, cortex, kern) liepen

sterk uiteen. Zij waren aanzienlijk lager (ca. 10 keer) dan die van weefsels als retina en lever. Het percentage sfigomyeline steeg, terwijl dat van fosfatidylcholine in gelijke mate daalde bij toename van de leeftijd van de weefsels. Deze relatie bleek bijna steeds onafhankelijk te zijn van de diersoort of van het fosfolipidengehalte. Het percentage fosfatidylserine was in de kalvslenskern hoger dan in de cortex of het epitheel. Het omgekeerde gold voor fosfatidylethanolamine en fosfatidylinositol. De opname van  $^{32}\text{P}$  in de fosfolipiden van kalvslenzen werd in vitro bestudeerd en die van rattelenzen zowel in vivo als in vitro. Incorporatie vond vooral plaats in epitheel en buitenste cortexlaag. De afzonderlijk geïncubeerde lenskern vertoonde een zeer geringe incorporatie.  $^{32}\text{P}_i$  werd snel geïncorporeerd in fosfatidezuur en fosfatidylinositol, langzamer in fosfatidylcholine en fosfatidylethanolamine en in geringe mate in de plasmalogenen, fosfatidylserine en difosfatidylglycerol. De activiteit van het enzym fosfatidylinositol inositolfosfohydrolase werd aangetoond in een cortexhomogenaat.

De invloed van de leeftijd op de fosfolipidensamenstelling van menselijke en dierlijke lenzen wordt in hoofdstuk 5 beschreven. De fosfolipidensamenstelling van de lens blijkt bij ouder worden te veranderen. De concentratie van sfigomyeline stijgt sterk, terwijl de concentraties van de meeste andere fosfolipiden dalen. Deze veranderingen zijn gecorreleerd met het proces van de celdifferentiatie en de vorming van de lenskern. De hoge percentages sfigomyeline (60–65%) en lysofosfatidylethanolamine (ca. 12%), zoals die in de oudere menselijke lens en in de vezels van de lenskern werden gevonden, zijn waarschijnlijk de hoogste, welke tot nu toe in weefsels werden aangetroffen. Menselijke en dierlijke lenzen vertonen enkele verschillen. Het gewicht van de menselijke lens blijft tijdens het leven voortdurend toenemen, terwijl bij lenzen van dieren een maximum schijnt te worden bereikt. De fosfolipidenconcentratie in de jonge menselijke lens neemt toe, terwijl deze bij de rat en het rund afneemt.

De resultaten van een studie, betreffende de membraansamenstelling en het fosfolipidenmetabolisme van cataracteuze lenzen, worden in hoofdstuk 6 besproken. De fosfolipidensamenstelling van menselijke lenzen met een seniele corticale cataract is vrijwel gelijk aan die van de overeenkomstige normale lenzen van dezelfde leeftijd.

De hoeveelheden gebonden lipiden en proteolipiden dalen echter in de cataract, hetgeen duidt op beschadiging van de membranen. In vivo en in vitro daalt de incorporatie van  $^{32}\text{P}$  in fosfatidylinositol in menselijke en dierlijke cataracten, terwijl die in fosfatidezuur en fosfatidylglycerol toeneemt. Bij korte incubaties van lenzen in een vroeg stadium van cataract treedt dit effect het duidelijkst naar voren. De incorporatie van  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol in fosfatidylinositol van cataracteuze lenzen wordt in tegenstelling tot die van  $^{32}\text{P}$  niet geremd, maar versneld.

In de volgende twee hoofdstukken worden enkele veranderingen in de cataractueuze lens aangetoond, welke deze verschillen in incorporatie kunnen verklaren. Een gaschromatografische analyse van lenshexitolen wees uit, dat bij diabetische en galactosemische ratten het myo-inositolgehalte van de lens daalt, terwijl het gehalte aan sorbitol, respectievelijk galactitol sterk stijgt (hoofdstuk 7). In het prevacuolaire stadium van de diabetische en de galactosecataract in vitro bleek de myo-inositol-permeabiliteit sterk veranderd te zijn. De myo-inositolopname wordt geremd, terwijl de efflux toeneemt. Ouabaïne remt het myo-inositoltransport in de lens, hetgeen suggereert, dat dit transport gekoppeld is aan de ouabaïne-gevoelige kationenpomp. Wanneer de zwelling van de lens in het prevacuolaire stadium van de suikercataract wordt verhinderd door osmotische compensatie van het medium met sorbitol, blijft de myo-inositolpermeabiliteit onveranderd. De permeabiliteitsveranderingen worden dus niet door de hoge sorbitol- of galactitolconcentraties op zich veroorzaakt, maar door de osmotische wateropname tengevolge van deze hoge concentraties.

Uit incubaties van kalfslenzen in cataractogene media blijkt, dat zwelling primair de oorzaak is van de remming van de incorporatie van  $^{32}\text{P}$  in fosfatidylinositol in de cortex (hoofdstuk 8). Dit verklaart het optreden van deze remming in verschillende soorten van cataract bij mens en dier. CTP en  $\text{Mg}^{2+}$  zijn beperkende factor en bij de incorporatie van  $^{32}\text{P}$  in fosfatidylinositol in de lenscortex. Zwelling in het prevacuolaire cataractstadium blijkt het totale CTP-gehalte van de cortex niet te verlagen, maar wel de CTP-concentratie in het lenswater. Hetzelfde geldt waarschijnlijk voor  $\text{Mg}^{2+}$ . Dit zou de verminderde  $^{32}\text{P}$ -incorporatie in fosfatidylinositol in dit stadium kunnen verklaren. In het microsomale systeem van de cortex komt naast de synthese van fosfatidylinositol (optimale pH 8,0) ook een door CMP gestimuleerde 'uitwisseling' van myo-inositol voor (optimale pH 7,0). Deze kan bij een fysiologische pH een belangrijke bijdrage leveren aan de incorporatie van precursors als  $^{32}\text{P}_i$  en  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol. Ook in het gevorderde stadium van cataract speelt deze 'uitwisselings-reaktie' mogelijk een belangrijke rol.

Gedeelten van dit proefschrift werden eerder gepubliceerd:

- R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 307.
- R. M. BROEKHUYSE en J. H. VEERKAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 316.
- R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 269.
- R. M. BROEKHUYSE, *Ophthalmologica*, 152 (1966) 510.
- R. M. BROEKHUYSE, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 457.
- J. BOON, R. M. BROEKHUYSE, P. VAN MUNSTER en E. SCHRETLEN, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 453.
- R. M. BROEKHUYSE, in H. Bloemendal, *Report on the Symp. on The Biochemistry of the Lens*, Nijmegen, 1968, *Exp. Eye Res.*, 8 (1969) 227, Abstract V, 5.
- R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 187 (1969), ter perse.

## SUMMARY

The lens contains only two types of cells: epithelial cells and fibers. It is one of the rare organs which can be isolated undamaged and cultured in a simple medium. For these reasons many workers are occupied with the investigation of the lens: in morphology and embryology (cell differentiation), protein chemistry and immunochemistry (biosynthesis and characterization of proteins), and pathology and biochemistry (cataract, sugar metabolism and active transport). On account of the important role of the cell membranes of the lens in almost each of the fields, a study was undertaken of a group of important structural components of these membranes: the phospholipids.

In this dissertation the influence of species, age, cell differentiation and cataract on the phospholipid composition of the lens is described. This composition is compared with that of other tissues of the eye. At the same time the results of an investigation into the influence of the cataractous state of the lens on the active myo-inositol transport and the metabolism of phosphatidylinositol are discussed.

In chapter 1 a summary is given of the present knowledge of the composition of the lens lipids, the energy metabolism and the active transport, the diabetic and galactose cataract and finally the ultrastructure of the galactose cataract.

The methods which were applied are described in chapter 2.

Chapter 3 presents a survey of the characterization of twelve phospholipids isolated from retina, iris, choroidea, lens, cornea, sclera and vitreous body. The  $^{32}\text{P}$ -labeled diacyl and vinyl-ether phospholipids have been identified by chromatographic comparison of their hydrolysis products with standards compounds. In all ocular tissues the following phospholipids are quantitatively most important: phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, ethanolamine plasmalogen, phosphatidylserine, sphingomyelin and phosphatidylinositol. The following components occur in small quantities: phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, choline plasmalogen, lysophosphatidylcholine, unidentified phospholipids and presumably also glyceryl-ether phospholipids.

In chapter 4 composition and metabolism of the phospholipids of normal animal lenses are described. The phospholipid contents of lenses of various species and of calf lens fraction (epithelium, cortex, nucleus) differ strongly. They are all considerable lower (about 10 times) than those of tissues like retina and liver. The percentage of sphingomyelin increases, while that of phosphatidylcholine decreases to the same extent with increasing age of the tissues.

This relation appears to be almost independent of species differences and phospholipid content. The percentage of phosphatidylserine in calf lens nucleus is higher than in cortex or epithelium. The reverse is true for phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol. Incorporation of  $^{32}\text{P}_i$  occurs especially in epithelium and outer cortex layers.  $^{32}\text{P}_i$  is rapidly incorporated into phosphatidic acid and phosphatidylinositol in vitro as well as in vivo. Vinyl-ether phospholipids, phosphatidylserine and sphingomyelin show very little or no  $^{32}\text{P}$ -incorporation. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine occupy an intermediate position. Lens nuclei incubated alone show a very low incorporation. The activity of the enzyme phosphatidylinositol inositol phosphohydrolase was demonstrated in a homogenate of lens cortex.

The influence of age on the phospholipid composition of human and animal lenses is described in chapter 5. It appeared that the phospholipid composition of the lens changes upon ageing. The concentration of sphingomyelin greatly increases, while the concentrations of almost all other phospholipids decrease. These changes are correlated with the process of cell differentiation and the formation of the lens nucleus. The high percentages of sphingomyelin (60–65 %) and lysophosphatidylethanolamine (12 %), determined in old human lenses and in the fibers of the nucleus, have never been found in other tissues. Human and animal lenses show some differences. The weight of the human lens increases continuously during life, while animal lenses seem to reach a maximum weight. The phospholipid content of the young human lens increases, while that of young rat and bovine lenses decreases.

In chapter 6 the results of a study of the membrane composition and phospholipid metabolism in cataractous lenses are presented. The phospholipid composition of human lenses with a senile cortical cataract is very similar to those of corresponding normal lenses of the same age. However, the amounts of bound lipids and of proteolipids decrease in cataract, which is an indication of membrane disintegration. In vivo and in vitro the  $^{32}\text{P}$ -incorporation into phosphatidylinositol decreases in human as well as in animal cataracts, while that of phosphatidic acid and phosphatidylglycerol increases. This effect is maximal when lenses in an early stage of cataract are incubated for a short period. The incorporation of  $[\text{}^3\text{H}]$ -myo-inositol in phosphatidylinositol of cataractous lenses is not inhibited (like the incorporation of  $^{32}\text{P}$ ) but accelerated.

In the following two chapters some changes in cataractous lenses which can explain this differences in incorporation rate are described. The gaschromatographic analysis of lens hexitols showed that in diabetic and galactosemic rats the myo-inositol content of the lens decreases, while the content of sorbitol, and galactitol, increases strongly (chapter 7). It appeared that there

is a marked change of myo-inositol permeability in the prevacuolar stage of diabetic and galactose cataract in vitro. The myo-inositol uptake is inhibited, while the efflux increases. Ouabain inhibits the myo-inositol transport in the lens, which suggest that this transport is coupled to the ouabain-sensitive cation pump. When the swelling of the lens in the prevacuolar stage of sugar cataract is inhibited by osmotic compensation of the medium with sorbitol, the permeability remains unchanged. Consequently the changes in permeability are not caused by the presence of sorbitol or galactitol as such, but by the osmotic swelling resulting from their presence in a high concentration.

From incubations of calf lenses in cataractogenous media it appears that swelling is primarily the cause of the inhibition of the  $^{32}\text{P}$  incorporation into phosphatidylinositol in the cortex (chapter 8). This explains the occurrence of this inhibition in various types of cataract in man and animal. CTP and  $\text{Mg}^{2+}$  are limiting factors during the incorporation of  $^{32}\text{P}$  into phosphatidylinositol in lens cortex. Swelling in the prevacuolar stage of cataract does not appear to reduce the total CTP content of the cortex but it does diminish the concentration in lens water. The same probably holds for  $\text{Mg}^{2+}$ . This could explain the decreased incorporation of  $^{32}\text{P}$  into phosphatidylinositol in this stage. In the microsomal system of the cortex a CMP-stimulated 'exchange' occurs of free myo-inositol with lipid bound myo-inositol (optimal pH 7,0) in addition to the biosynthesis of phosphatidylinositol (optimal pH 8,0). This 'exchange' may supply an important contribution to the incorporation of precursors as  $^{32}\text{P}_i$  and  $[^3\text{H}]$ -myo-inositol at a physiological pH. In the advanced stage of cataract this 'exchange reaction' possibly also plays an important role.

Parts of this thesis have been published previously:

R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 307.

R. M. BROEKHUYSE and J. H. VEERKAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 316.

R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 269.

R. M. BROEKHUYSE, *Ophthalmologica*, 152 (1966) 510.

R. M. BROEKHUYSE, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 457.

J. BOON, R. M. BROEKHUYSE, P. VAN MUNSTER and E. SCHRETLEN, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 453.

R. M. BROEKHUYSE, in H. Bloemendal, *Report on the Symp. on The Biochemistry of the Lens*, Nijmegen, 1968, *Exp. Eye Res.*, 8 (1969) 227, Abstract V, 5.

R. M. BROEKHUYSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 187 (1969), in the press.









# STELLINGEN

## I

De argumenten, welke Spector c.s. aanvoeren om het HL-proteïne als een niet-geacetyleerd  $\alpha$ -kristalline te beschouwen, zijn aanvechtbaar.

A. Spector, Th. Wandel en Lu-Ku Li, *Invest. Ophthalmol.*, 7 (1968) 179.

## II

De beschikbaarheid van een cofactor kan de observatie van Cone en Brown verklaren, dat een kleine incubatiekamer essentieel is voor de spontane regeneratie van rhodopsine in de geïsoleerde ratteretina.

R. A. Cone en P. K. Brown, *Nature*, 221 (1969) 818.

## III

Het is niet bewezen, dat de rattelens met een galactosecataract een andere fosfolipidensamenstelling heeft dan de normale lens.

B. Plazonnet, P. Tronche, B. Bastide en J. Komor, *C.R. Soc. Biol.*, 163 (1969) 398.

## IV

De door Liotet en Réveilleau gepubliceerde resultaten, betreffende het eiwit-spectrum van patiëntentranen, kunnen de toets der kritiek niet doorstaan.

S. Liotet en J. Réveilleau, *Ann. Oculist.*, 198 (1965) 12.

## V

De conclusie, dat fosfatidylcholine het belangrijkste fosfolipide in de cortex van de menselijke seniele cataract is, is onjuist.

Z. Vass en I. Tapasztó, *Acta Ophthalmol. Kbn.*, 45 (1967) 68.  
Dit proefschrift, p. 66.

## VI

De door Szeinberg c.s. gevonden fosfolipidensamenstelling voor normale en glucose-6-fosfaat dehydrogenase deficiënte erythrocyten is sterk beïnvloed door de gevolgde onderzoekmethode.

A. Szeinberg, J. Zaidman en L. Clejan, *Biochim. Biophys. Acta*, 98 (1965) 598.



## VII

De maximale snelheid van de glyoxylaat-fenylhydrazon-vorming wordt waarschijnlijk door de dehydratatie-snelheid van het glyoxylaat-hydraat bepaald.

K. S. Choi, K. W. Lee en A. H. Roush, *Anal. Biochem.*, 17 (1966) 413.

## VIII

Het gebruik van silicagelkolommen voor de scheiding van  $^{32}\text{P}$ -fosfolipiden bij metabolische studies van deze lipiden, is aan bedenkingen onderhevig.

A. G. Ulsamer en J. L. Glenn, *Biochim. Biophys. Acta*, 125 (1966) 525.

## IX

Dische c.s. vonden in erythrocyten voor de verhouding neuraminezuur:hexose (-amine) een hogere waarde dan in lensmembranen. Dit kan verklaard worden door de aanwezigheid van ceramide-polyhexosiden in de lens.

Z. Dische, M. A. Hairstone en G. Zelmenis, in H. Peeters, *Protides of the Biological Fluids*, Vol. 15, 1967, Elsevier, Amsterdam, 1968, p. 123.

G. L. Feldman, L. S. Feldman en G. Rouser, *Lipids*, 1 (1966) 21.

## X

Bij een vergelijkend onderzoek van de permeabiliteit van erythrocytenmembranen van verschillende dierspecies met behulp van de hemolysemethode, moet rekening gehouden worden met de verschillen in osmotische resistentie.

J. de Gier, L. L. M. van Deenen en K. G. van Senden, *Experientia*, 22 (1966) 20.

## XI

De door Samejima en Kita gegeven voorstelling van de conformatie-veranderingen van katalase door ligandmolekullen, berust op een onvoldoende interpretatie van de meetgegevens.

T. Samejima en M. Kita, *Biochim. Biophys. Acta*, 175 (1969) 24.







